

# Endotelets rolle i blodkar

Med fokus på flow-mediert dilatasjon (FMD)



**Studmed. Don Ransi Liyanarachi**

**Studmed. Adeel A. Anwar**

**Veileder: Prof. dr. philos. Einar Stranden**



Mai 2010

Det Medisinske Fakultet, Universitetet i Oslo

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Innledning</b>	<b>5</b>
<b>DEL 1 – TEORI OM ENDOTEL</b>	<b>6</b>
<b>Endotelets struktur</b>	<b>6</b>
<i>Heterogenitet mellom forskjellige organer</i>	7
<i>Heterogenitet mellom arterielt og venøst endotel</i>	9
<b>Karreguleringens hovedprinsipper</b>	<b>10</b>
<i>Nitrogenoksid</i>	10
<i>Prostacyklin</i>	12
<i>Endothelin-1</i>	13
<i>Samspillet mellom endotel og glatte muskelceller</i>	13
<i>Mekanotransduksjon</i>	14
<b>Endotel dysfunksjon og patogenese</b>	<b>16</b>
<i>Tobakksrøyk</i>	16
<i>Dyslipidemi</i>	17
<i>Hypertriglyseridemi</i>	17
<i>Hyperhomocysteinemi</i>	18
<i>Diabetes mellitus</i>	19
<i>Arteriell hypertensjon</i>	19
<i>Cerebrovaskulær sykdom</i>	20
<i>Overvekt</i>	21

<i>Angina pectoris</i>	22
<i>Hjertesvikt</i>	23
<i>Erekttil dysfunksjon</i>	24
<b>Flow-mediert dilatasjon (FMD)</b>	<b>25</b>
<b>DEL 2 – EKSEMPEL PÅ MÅLING AV FMD</b>	<b>27</b>
<b>Metode</b>	<b>27</b>
<b>Resultat</b>	<b>28</b>
<b>Diskusjon/analyse</b>	<b>32</b>
<b>Litteraturliste</b>	<b>34</b>

## Forord

Denne presentasjonen er en studentoppgave fullført i det 11. semester av medisinstudiet ved Det Medisinske Fakultet, Universitetet i Oslo.

Vi vil gjerne rette en takk til Prof. dr. philos. Einar Stranden, leder for sirkulasjonsfysiologisk seksjon ved Oslo universitetssykehus, Aker, for hans formidable bidrag med veiledning og kritisk vurdering av denne oppgaven, samt for god faglig dialog underveis i prosessen. Han har ledet oss til mye relevant faglitteratur som har vært til stor hjelp ved utformingen av denne oppgaven. Vi ønsker også å takke dr. philos. Jonny Hisdal for hans bidrag med å sikre gode målinger til oppgavens praktiske del.

Mye av materialet er hentet fra bøkene "The Vascular Endothelium" I og II, av Salvador Moncada og Annie Higgs, utgitt 2006 på Springer-Verlag, Berlin.

## Abstract

The vascular endothelium has long been considered a passive inner lining of blood vessels. But in recent decades several observations have proved its involvement in vital functions of the cardiovascular system, including regulation of perfusion, fluid and solute exchange, haemostasis and coagulation, inflammatory responses, vasculogenesis and angiogenesis<sup>4-7</sup>. This involvement has further been proven to play a profound role in the pathogenesis of cardiovascular disease<sup>1</sup>, and therefore a parameter to measure endothelial function is in growing demand. Several studies have suggested that the parameter FMD (flow-mediated dilation) could be clinically applied in such measurements<sup>121,122,124</sup>. However the clinical significance of FMD in the general population is still under investigation. In order to apply this parameter to the general population, one must find ways to standardize different aspects of measurement and generate reference ranges.

In this presentation we consider the relevant anatomical and physiological aspects of vascular endothelium, and its role in different aspects of cardiovascular disease. The strengths and weaknesses of FMD are highlighted, before we conclude with a brief presentation of an example of how to clinically measure FMD.

## Innledning

I denne oppgaven vil vi se nærmere på flow-mediert dilatasjon (FMD) av kar, som en kvantifiserbar enhet og måleparameter, belyse dens diagnostiske egenskaper og gjøre rede for hvordan den kan måles og følges i en klinisk forsøkssammenheng. Det forskes for tiden mye på endotelets rolle i ulike patologiske prosesser, og selv om mange av mekanismene fremdeles ikke er fullstendig kartlagt er det bred enighet om at endotelet har en sentral rolle i utviklingen av flere hjerte- og karsykdommer. Dette har skapt et behov for å identifisere endotelets funksjon, eventuelt dysfunksjon. Med utgangspunkt i endotelets egenskaper og funksjon kan dette måles på tre forskjellige måter<sup>1</sup>

- måling av de morfologiske og mekaniske egenskapene i karveggen, (bla. tykkelsen av intima media-laget og veggens strekkbarhet)
- kvantifisere markører produsert i endotelet (for eksempel von Willebrandt faktor, plasminogen aktivator, inhibitor komplekser til trombomodulin adhesjonsmolekyler og nitrogenoksider)
- måle endotel-avhengig regulering av vaskulær tonus (FMD)

Oppgaven er todelt, der første del tar for seg endotelet som en anatomisk struktur med vekt på dens perfusjonsregulerende egenskaper opp imot parameteren FMD. Denne delen vil ende i en utredning og definisjon av FMD, der dens kliniske og diagnostiske muligheter belyses. I oppgavens andre del presenterer og gjennomfører vi et eksempel på hvordan man kan gjennomføre en måling av parameteren FMD.

# DEL 1 – TEORI OM ENDOTEL

## Endotelets struktur

Finn Genesers

lærebok i histologi

beskriver endotel

som et spesialisert

enlaget epitelcellelag

som danner den

luminale overflaten

av det innerste laget i

sirkulasjonssystemet

(tunica intima), fra

hjertet til de minste

kapillærene og

lymfesystemet (Fig.

1). Cellene er som

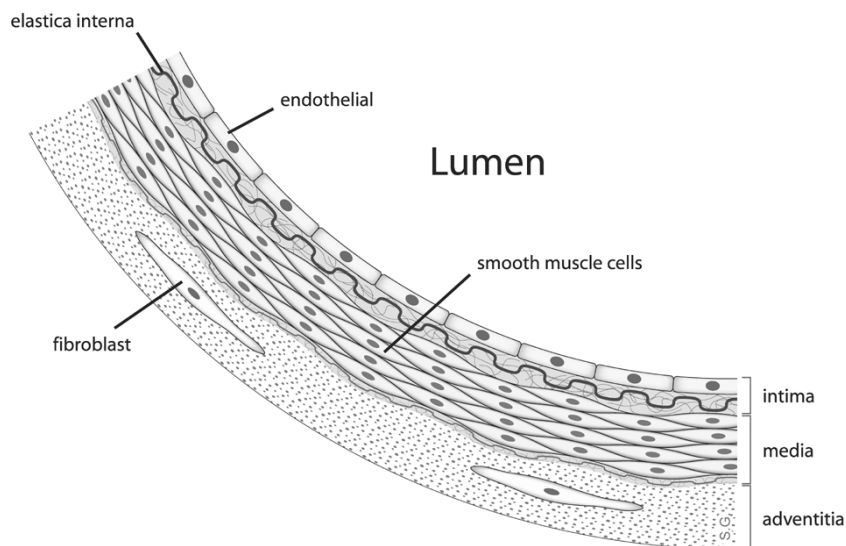
regel forbundet med

zonula occludens med

nært tilknyttede nexi,

og hviler på en

basalmembran som skiller tunica intima fra det neste laget<sup>2</sup>.



Figur 1. Tverrsnitt av arterievegg. Illustrasjonen er hentet fra internetpresentasjon av Stijn Al et al. 2005: Anatomy overview of a human artery.

Lenge ble endotelet sett på som en homogen cellepopulasjon som hadde som eneste funksjon å skille kar-lumen fra interstitsiet, men denne misoppfatningen ble i 1966 utfordret av Lord Florey<sup>3</sup> som ved hjelp av sitt elektronmikroskop ikke bare påpekte anatomiske forskjeller i endotelet, men også spekulerte i om endotelet kunne ha en viktig rolle i både fysiologi og patologi. Han oppdaget strukturelle forskjeller i endotelet hos pasienter med både diabetes og glomerulær nefritt og fant økt lekkasje av plasma ut av blodbanen ved inflammasjon som gjorde at han allerede da mistenkte at endotelet kunne spille en viktig rolle i utviklingen av aterosklerose. For om lag 25 år siden ble det gjort flere gjennombrudd i forskningen på endotelets rolle i reguleringen av vaskulær glatt muskeltonus og koagulasjonsprosessen, som bekreftet at endotelet ikke var en passiv barriere<sup>4-7</sup>. I dag vet vi at endotel, med sine 350 m<sup>2</sup> og 110 g<sup>8</sup>, spiller en viktig rolle ved flere sider av det kardiovaskulære systemet, bla:

- Perfusjonsregulering – via endogene mediatorer som prostacyklin, nitrogenoksid, endothelin-1 og angiotensinkonverterende enzym.
- Hemostase og koagulasjon – via et intrikat samspill mellom antikoagulatoriske stoffer som prostacyklin, nitrogenoksid, og heparinsulfat, og koagulasjonsfremmende som von Willebrand-faktor.

- Inflammasjonsrespons – via kontrollert vandring av leukocytter gjennom karveggen, og lekkasje av plasmaproteiner og væske ut fra blodbanen.
- Transport og utveksling av væske og substanser imellom blod og omgivelser- via diffusjon gjennom celler og intercellulære spalter, porer og fasilitert transport.
- Vaskulogenese og angiogenese

Det finnes forskjellige fenotyper av endotel, og det er vanlig å dele de inn i tre kategorier ut ifra forskjeller i intercellulære bindingspunkter; kontinuerlig, fenestrert og ikke-kontinuerlig<sup>9</sup>. Denne fenotypen er avgjørende for permeabiliteten endotelet utviser, men bakgrunnen for denne heterogeniteten er i dag fremdeles ikke kjent, dog finnes det to teorier. Den intrinsiske hypotesen går ut på at de spesifikke fenotypene er genetisk forhåndsbestemt allerede før endotelcellene migrerer fra mesoderm til deres spesifikke plassering i sirkulasjonssystemet. Denne hypotesen støttes av studier av celler som viser at koronar endotel og endocard har spesifikt embriologisk opphav<sup>10,11</sup>. Den ekstrinsiske hypotesen derimot tar utgangspunkt i flere studier som viser endotelets evne til å tilpasse seg miljøfaktorer slik som mekanisk stress, tilgjengelige mediatorer, celle til celle og interaksjon mellom celle og matrix, og partialtrykk av tilgjengelig oksygen og karbondioksid. Denne hypotesen underbygges av flere studier der celler transplantert fra et vev til et annet har stimulert til dannelse av en annen endotel fenotype<sup>12-14</sup>. Derfor er det nærliggende å anta at den fenotypiske heterogeniteten av endotel er et resultat av både genetiske- og miljøfaktorer.

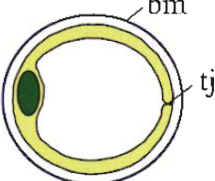
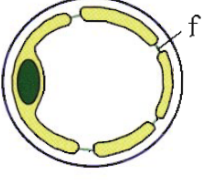
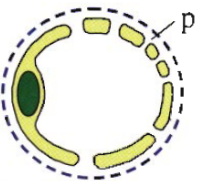
Selv om endotel, med dets evne til å reagere på forskjellig kjemisk og fysisk stimuli finnes i alle klasser av virveldyr<sup>15</sup> er det også betydelige forskjeller mellom de forskjellige artene. Disse forskjellene i struktur<sup>16</sup>, metabolisme<sup>17</sup>, signalmekanismer<sup>18</sup> og uttrykk av intracellulære og overflatemolekyler<sup>19,20</sup> gjør at funn på dyreforsøk ikke alltid kan overføres til oss mennesker.

### ***Heterogenitet mellom forskjellige organer***

Som nevnt over kan endotelet i en organisme deles inn i forskjellige fenotyper på basis av morfologi og permeabilitet (Fig. 2). I kontinuerlige kapillærer bindes endotelcellene bare i de intercellulære "tight junctions" som dermed er den dominerende lokalisasjonen for transport av vann, glukose, urea og andre hydrofile molekyler. Dette betyr at det individuelle antallet "tight junctions" er den viktigste faktoren for permeabilitet i denne typen endotel, som man blant annet finner i blod-hjerne-barrieren<sup>21</sup>.

Fenestrerte kapillærer har porer på 50-60 nm i diameter som er lukket med en membran. Disse kapillærene er mer permeable for hydrofile molekyler med lav molekylærvækt og vann, og finnes særlig i steder med filtrasjon, sekresjon og absorpsjon. Fenestrert endotel finnes gjerne i nær lokalisasjon til andre epitelceller, og dette har ført til hypoteser om at en mulig interaksjon mellom disse celletypene kan være årsaken til dannelsen av disse fenestrase<sup>22</sup>.

Vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) kan være et mulig parakrint signalmolekyl i denne differensieringen, da det finnes i høyere nivåer i epitelceller som ligger ved fenestrert endotel<sup>23</sup>, samtidig som VEGF induserer fenestraler i kapillærer in vivo<sup>24</sup>.

phenotype	organ	function
continuous 	CNS lymph node muscle	blood-brain barrier lymphocyte homing metabolic exchange
fenestrated 	endocrine glands gastrointestinal tract choroid plexus kidney glomeruli	secretion absorption secretion filtration
discontinuous 	liver bone marrow spleen	particle exchange hematopoiesis blood cell filter

Figur 2. Figuren viser hvordan endotel fenotype klassifiseres ut i fra forskjeller i intrer- og intracellulære bindingspunkter. Deres lokalisasjon og funksjon er også presisert<sup>155</sup>.

Ikke-kontinuerlige kapillærer har store inter- og

intracellulære spalter på 0,1-1  $\mu\text{m}$  i diameter, uten overliggende membran. I tillegg er basalmembranen enten helt fraværende eller har tilsvarende spalter. Dette er dynamiske spalter som har mulighet til å endre lokalisasjon i forhold til celleveggen. For eksempel er de endoteliale spaltene i hepatiske sinusoider klynget sammen i områder som kontrollerer utvekslingen av væsker, oppløste stoffer og makromolekyler, mellom sinusoidene og Disses rom<sup>25</sup>. Behandling med medikamenter som løser opp aktin-filamentene induserer en betydelig økning i antall spalter. Dette tyder på at aktin cytoskjeletet er involvert i reguleringen av antall spalter i de ikke-kontinuerlige kapillærene<sup>26</sup>. Spaltene kan også kontrahere og dilatere avhengig av de intracellulære kalsiumkonsentrasjonene i endotelet. Forsøk viser at kalsium-calmodulin-actomyosin-kaskaden spiller en viktig rolle i denne reguleringen av spalteåpningene<sup>27</sup>.

I tillegg til disse morfologiske forskjellene, er det også forskjeller innad i endotel fenotypene fra forskjellige steder i kroppen. Disse forskjellene er uttrykk av proteiner og cellulær funksjon, som dermed betyr at endotelet er høyt tilpasset forholdene og kravene i det spesifikke organ. Slik organspesifikk variasjon i proteinuttrykk og cellulær funksjon finner vi blant annet i blod-hjerne-barrieren, høyendotels-venyler i perifere lymfeknuter og pulmonart endotel.



## ***Heterogenitet mellom arterielt og venøst endotel***

Endotelceller fra arterier og vener varierer både i morfologi og funksjon. I arterier er de gjerne mer langstrakte og kan ha en bredde-lengde ratio på 1:6,8, mens i kapillærer og særlig i vener har endotelcellene en mer rundere form, bredde-lengde ratio på henholdsvis 1:4,7 og 1:2,4<sup>28</sup>. Endotel-avhengig dilatasjon er som regel mer uttalt i arterier enn de korresponderende venene<sup>29</sup>, og siden de fleste vener responderer bra til nitrovasodilatorer, betyr dette at denne forskjellen i endotel-avhengig respons trolig skyldes selve endotelet, og ikke den glatte muskulaturen<sup>30</sup>. På mikrovaskulært nivå er nitrogenoksid mediert dilatasjon som respons på økte skjærekrefter mer uttalt i arterioler enn i venyler i epicardiet hos griser<sup>31</sup>, og dette stemmer bra med kunnskapen om at verdien av nitrogenoksid syntase er høyere i arteriole-endotel enn venyle-endotel<sup>32</sup>.

Leukocyt-endotel interaksjonene skjer derimot mest i venylene, og forekommer bare i arteriolene ved uttalt vevsskade<sup>33</sup>. Lenge trodde man at den økte blodføringen i arteriolene hindret en slik adhesjon mellom leukocytter og endotel, men dette ble tilbakevist av flere studier som bekreftet at dette skyldes forskjellig uttrykking av proteiner i endotelet, da de fleste adhesjonsmolekylene uttrykkes utelukkende eller i størst grad i venyle-endotel<sup>34</sup>. Dog spiller hemodynamiske forhold også inn på uttrykket av noen adhesjonsmolekyler, særlig ICAM-1<sup>35</sup>, noe som stemmer godt overens med at lunge-arterioler som er utsatt for lavere skjærekrefter uttrykker mer ICAM-1 og spiller en betydelig rolle i interaksjonen mellom sirkulerende leukocytter og endotel<sup>36</sup>. Dette belyser nettopp det at forskjellene i arterielt og venøst endotel skyldes en blanding av genetiske og hemodynamiske miljøfaktorer.

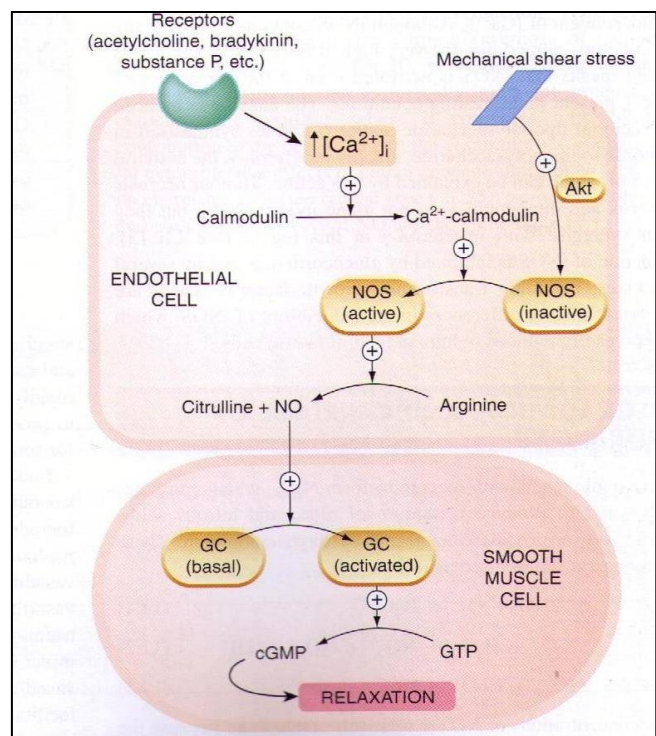
## Karreguleringens hovedprinsipper

Karsystemet har et mangfold av kontrollmekanismer som arbeider sammen for å opprettholde adekvat blodføring. Ved et gitt blodtrykk, er blodføringen til et hvert organ bestemt av den vaskulære motstanden, som igjen er regulert av sentrale og lokale mekanismer. Endotelcellene i åreveggen spiller en avgjørende rolle i denne sammenhengen. Mange av disse mekanismene er mediert ved frigjøringen av vasodilatatoren nitrogenoksid (NO). Frigjøringen av NO oppstår som respons til hemodynamiske stimuli utøvet på endotelcellene av strømmen av blod (skjærekrefter), og den sykliske belastningen på åreveggen. NO er ikke den eneste endotelderiverte vasodilatatoren, da skjærekraften og den sykliske belastningen også stimulerer dannelsen av blant annet prostacyklinet prostaglandin-12 ( $\text{PGI}_2$ ) og endothelin-1 (ET-1). Arachidonsyreproduktet  $\text{PGI}_2$  er blant annet en kjent vasodilatator mens ET-1 er en potent vasokonstriktor<sup>65</sup>. I dette kapittelet vil vi gå nærmere inn på virkningsmekanismene.

### Nitrogenoksid

Hovedstimuluset for utslipp av NO er økte skjærekrefter utøvet på endotelcellene. Stimuluset fører til fosforylering av eNOS via proteinkinasen Akt. Dette gjør at eNOS blir mer sensitiv for  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-komplekset og dermed aktiveres. eNOS omdanner så aminosyren L-Arginine til NO og biproduktet citrulline. NO vil så diffundere til muskelcellene som omgir karet, hvor den aktiverer guanylcyclase (GC) som omdanner guanosin-5'-trifosfat (GTP) til cyklisk-guanosinmonofosfat (cGMP). Dette fører til relaksasjon av muskelcellene (Fig. 3).

NO er generert av endotelial NO syntase (eNOS), og aktiviteten til denne syntasen kan bli regulert av  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengige eller  $\text{Ca}^{2+}$ -uavhengige prosesser. eNOS var opprinnelig klassifisert som et  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-avhengig enzym<sup>37</sup>, men det er nå tydelig at eNOS kan bli aktivert uten en vedvarende økning av  $\text{Ca}^{2+}$  -

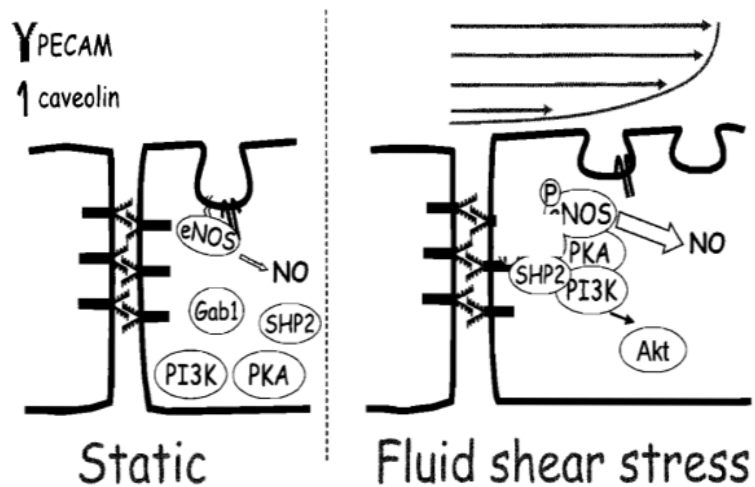


Figur 3. Bildet viser kaskaden som gjør at økte skjærekrefter fører til NO produksjon som deretter relakserer de glatte muskelcellene. Skjærekreftene ved økt blodføring fører til at Akt fosforylerer NOS noe som fører til at NOS blir mer sensitiv for  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin komplekset og blir aktivert. NOS omdanner L-arginin til NO og citrulline. NO aktiverer GC som omdanner GTP til cyklisk-GMP og fører til relaksasjon i muskelcellen<sup>156</sup>.

konsentrasjon. Den viktigste av disse stimuli er "fluid shear stress" (skjærekrefter), generert av det viskøse draget av strømmen av blod over endotelcellene, som fører til 2-4-dobling av NO produksjon i forhold til basalverdiene (Fig.4). Denne produksjonen opprettholdes så lenge stimulusen er tilstede.

eNOS kan også aktiveres ved økning av  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon, som fører til at NO produksjonen øker med 10-20-dobling av basalverdiene, men dette er en forbigående prosess (fra sekunder til minutter) som ikke opprettholdes over tid.

Dette viser at en vedvarende økning av  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon ikke er nødvendig for den skjærekraftinduserte aktiveringen av eNOS<sup>38</sup>. Når det er sagt, så er skjærekraftindusert produksjon av NO bifasisk, hvor man initialt har en  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig peak etterfulgt av en vedvarende  $\text{Ca}^{2+}$ -uavhengig platåfase.



Figur 4. Figuren illustrerer eNOS signalosomets sammensetning. Til venstre ser vi en celle som ikke er utsatt for hemodynamisk stimuli. Her er eNOS tett bundet til proteinet caveolin i caveolae, og produserer dermed små mengder NO. Til høyre ser vi hvordan økte skjærekrefter fører til omorganisering i eNOS signalosomet som fører til økt utskillelse av NO<sup>155</sup>.

Skjærekraft induisert økning av NO produksjon er assosiert med eNOS fosforylering og en økt sensitivitet av enzymet for  $\text{Ca}^{2+}$ , slik at enzymet også kan bli aktivert av basale  $\text{Ca}^{2+}$  verdier<sup>39</sup>.

Aktiveringen og fosforyleringen av eNOS er en kjedeprosess hvor blant annet Gab1 og SHP2 spiller en viktig rolle. Gab1 er et adapterprotein og man vet at den translokerer til cellemembranen som respons til "fluid shear stress"<sup>40</sup>, og kan binde seg til PECAM1.

Caveolin og heat shock protein (Hsp90) spiller også en viktig rolle i reguleringen av eNOS aktiviteten. I endotelcellene er eNOS lokalisert i caveolae, som er kolesterolrike invaginasjoner i plasmamembranen. Kolesterolmangel i membranen hemmer agonist-indusert relaksasjon på grunn av endring i caveolær struktur og eNOS signalkomplekset<sup>41</sup>, mens hyperkolestrolemi er vist å dempe NO utslipp ved å bedre interaksjonen mellom caveolin-1 og eNOS og dermed føre til hemmet relaksasjon<sup>42</sup>.

Hsp90 fungerer som et stillas ved bindingen av komponenter innenfor eNOS signalosomet, og assosiasjonen mellom eNOS og Hsp90 er blitt påvist i respons til "fluid shear stress"<sup>43</sup>.

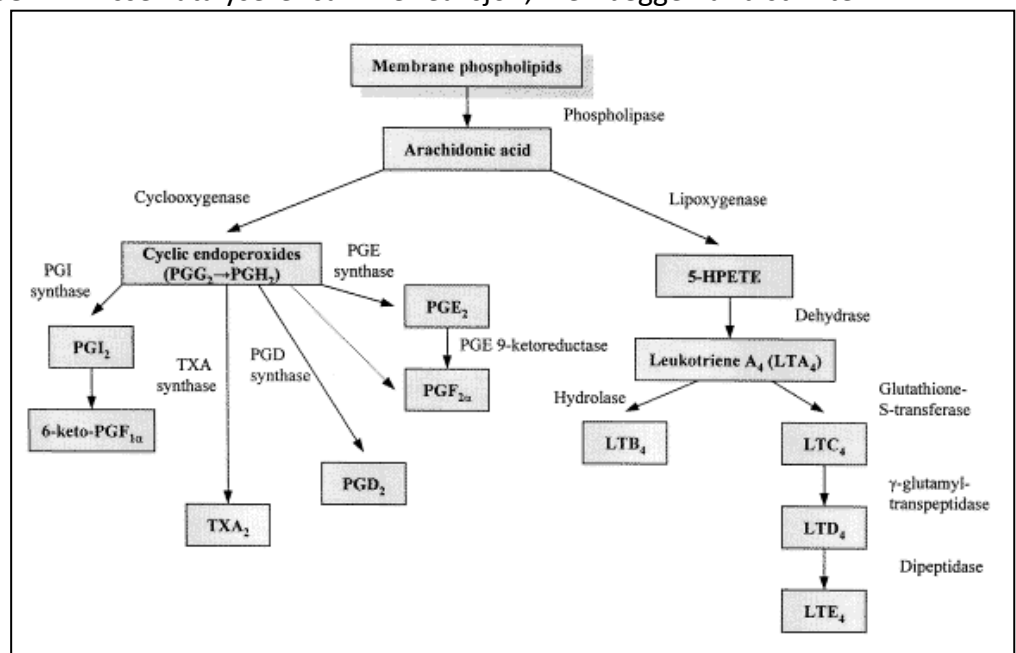
Ekspresjonen og transkripsjonen av eNOS er regulert av flere faktorer. Østrogen, TNF- $\alpha$ , og skjærekrefter er de best kjente faktorene som gir økte eNOS proteinnivåer. Østrogens fordelaktige effekter på det kardiovaskulære system, kan relateres til bedret vaskulær funksjon, som i hovedsak skyldes økt NO produksjon. Skjærekreftene øker også eNOS mRNA og proteinnivåer. Den økte ekspresjonen av eNOS hos dyr<sup>44</sup> og mennesker<sup>45</sup> under trening, tror man skyldes økte skjærekrefter på endotelet.

## Prostacyclin

Et nøkkelenzym i syntesen av prostanoider er cyclooxygenase (COX). Det er identifisert to isomerer, COX-1 og COX-2. Disse katalyserer samme reaksjon, men begge har distinkte

farmakologiske profiler og biologiske roller. COX-1 uttrykkes konstitutivt, mens COX-2 er uttrykt i respons til pro-inflammatoriske stimuli. Ekspresjonen av begge enzymer i endotelceller er modulert av skjærekrefter.

COX-2 er avhengig av amplituden av skjærekreftene, mens ekspresjonen av COX-1 ser ut til å være uavhengig av dette.



Figur 5. Figuren viser dannelsen av de forskjellige arachidonsyre-produktene via cyclooxygenase og lipoxygenase. En av endeproduktene, prostanoidet PGI<sub>2</sub>, er en kjent vasodilator<sup>157</sup>.

Selve COX substratet er Arachidonsyre, og tilgjengeligheten av denne syren er den begrensende faktoren i prostaglandinsyntesen i endotelceller (Fig. 5). Endeproduktet er som kjent blant annet PGI<sub>2</sub>. Aktiveringen av fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) er Ca<sup>2+</sup> avhengig, noe som fører til at syntesen av PGI<sub>2</sub> er en Ca<sup>2+</sup> avhengig prosess, akkurat som NO produksjon. Avhengigheten av Ca<sup>2+</sup> i begge disse prosesser fører til at i de fleste tilfeller blir både PGI<sub>2</sub> og NO frigitt samtidig. Når det er sagt, ser det ut som at aktiveringen av PLA<sub>2</sub> krever høyere nivåer av Ca<sup>2+</sup> enn NO syntesen<sup>46</sup>. Denne forskjellen kan være med på å forklare hvorfor den sykliske belastningen av åreveggen er en bedre stimulus for PGI<sub>2</sub> syntese enn skjærekrefter, i

og med at den sykliske belastningen av åreveggen induserer en markant økning i endotelial  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjon<sup>47</sup>.

### ***Endothelin-1***

Endothelin-1 (ET-1) er et aminosyrepeptid som blir produsert i flere celletyper, inkludert vaskulært endotel. Produksjonen og utskillelsen av ET-1 blir regulert av flere metabolske og hormonelle faktorer som for eksempel hypoksi. Men de viktigste faktorene er skjærekreftene og den sykliske belastningen på endotelet.

ET-1 binder seg til endothelinreseptorene  $\text{ET}_A$  og  $\text{ET}_B$ .  $\text{ET}_A$  reseptorene befinner seg på glatte muskelceller og medierer vasokonstriksjon, mens  $\text{ET}_B$  er lokalisert på endotel og er forbundet med NO og  $\text{PGI}_2$  syntese. Flere bevis tyder på at NO hemmer ET-1 produksjonen. For eksempel er skjærekraftindusert nedgang av ET-1 ekspresjon mediert gjennom aktivering av eNOS<sup>48</sup>, og inhalert NO kan redusere ET-1 nivåer i plasma hos mennesker<sup>49</sup>.

Utskillelsen av ET-1 fra endotelceller utsatt for økte skjærekrefter varierer i tid på en bifasisk måte. Fysiologiske nivåer av skjærekreftene induserer først en tidlig forbigående oppregulering av ET-1 gen-ekspresjon etterfulgt av en vedvarende undertrykning<sup>50</sup>. Dette er til forskjell fra celler utsatt for pulsatile trykkforandringer i kombinasjon med pulsatile skjærekrefter, som er typisk for celler i områder med utvikling av aterosklerotiske plakk. I denne situasjonen vil eNOS nivåer ikke øke i lik grad som i celler utsatt for økte skjærekrefter alene, og ET-1 mRNA nivået vil øke med tid<sup>51</sup>. Produksjonen av NO og ET-1 er ikke utelukkende bestemt av forandringer i skjærekrefter, men kan også varieres av økt trykk/syklisk belastning<sup>52</sup>. For eksempel, mens økt belastning på åreveggen øker produksjonen av ET-1, har dette liten til ingen effekt på ekspresjonen av eNOS. Dette kan lede til en hypotese om at økt intravaskulært trykk (som ved hypertensjon), selektivt vil øke produksjonen av denne potente vasokonstriktoren. Det er avklart at eNOS-hemming forhindrer nedreguleringen av ET-1 mRNA gjennom skjærekrefter, men det rapporteres at kronisk eksponering for økte skjærekrefter oppregulerer ekspresjonen av  $\text{ET}_B$  reseptorer, dette også via en NO avhengig prosess<sup>48</sup>.

### ***Samsillet mellom endotel og vaskulære glatte muskelceller***

NO produsert av eNOS diffunderer fritt til glatte muskelceller, hvor den aktiverer guanylyl cyclase, og produserer guanosine 3'5' syklisk monofosfat (cGMP). Syklisk GMP aktiverer både enzymene PKG og PKA som leder til relaksasjon av glatt muskulatur. NO kan også påvirke vaskulær tone via andre mekanismer.

Et forslag bygger på at NO kan modulere produksjonen av en vasokonstriktor-eikosanoid uavhengig av cyklisk GMP<sup>53</sup>. Dette eikosanoidet heter 20-hydroxyeicosatetraenoisk syre (20-HETE). Dette er en arachidonsyreprodukt generert av CYP 4A enzymer i vaskulære glatte muskelceller. Her tror man at den generer myogen tonus<sup>53</sup>. Man vet at CYP 4A komponentene finnes i vaskulære glatte muskelceller, og at 20-HETE produseres endogent av glatte muskelceller i renale og cerebrale kar som respons til strekk og økning i transmuraltrykk<sup>53</sup>, denne prosessen påvirkes ikke av COX-hemming og endoperoxid/tromboksan reseptor antagonisme.

NO kan modulere formasjonen av 20-HETE ved å binde og inaktivere P450<sup>54</sup>. Denne effekten kan forklare den cyklisk GMP uavhengige vasodilatasjonen NO har i noen arteriepreparater<sup>55</sup>.

Motstandsnettverket som kontrollerer blodføring til skjelettmuskulatur består av terminale arterioler, større arterioler og små tilførende arterier som fører blodet over i arteriolesengen. I kontraherende skjelettmuskulatur, vil lav PO<sub>2</sub> og andre vasoaktive metabolitter fremprovosere en lokal respons og initiere en sammenhengende vasodilatasjon som stiger oppover kartreet, til og med opp til disse tilførende arteriene. Alt dette øker blodføringen til muskelen. Denne koordinerte longitudinale transmisjonen av vasomotorreflekser er essensiell for å oppnå optimal organperfusjon<sup>56</sup>.

Denne sammenhengende vasodilatasjonen har blitt undersøkt intensivt, men de eksakte mekanismene er enda ikke helt klare. Allikevel er denne oppadstigende dilatasjonen ved hjelp av bradykinin og acetylcholin blitt tilskrevet NO utslipp i forsøk med hamster<sup>57</sup>. Imidlertid har flere forskere ikke greid å fastslå en avgjørende rolle for NO i denne sammenhengende vasodilatasjonen<sup>58</sup>, da responsen tydeligvis er intakt i eNOS knockout mus<sup>59</sup>.

## ***Mekanotransduksjon***

Man har tidligere trodd at det første steget som oversetter den fysiske stimulusen til økning i endotel autocoid produksjon har vært en aktivering av en spesifikk mekanoreseptor som ionekanaler eller komponenter av glycocalyx, men senere tankegang har ledet til at man klassifiserer hele endotel cytoskjelettet som en mekanoreseptor<sup>60</sup>.

Caveolae, er som nevnt små cellemembran-invaginasjoner, ca 50-100 nm i diameter, og finnes i mange celler i det kardiovaskulære system (endotelceller, glatte muskelceller, makrofager, myocytter i hjertet og fibroblaster). Over de seneste få årene har det blitt klart at disse cellulære mikrodomenene inneholder et stort antall aktive signalmolekyler. Det er også vist at kronisk eksponering for økte skjærekrefter øker caveolae-formasjonene, og dermed forsterkes cellulære responser til forandringer i fysisk stimulering<sup>61</sup>.

Eksposering av endotelceller til økte skjærekrefter og syklisk belastning fører til endringer i cytoskjettoorganisering og redistribusjon av fokale adhesjonsproteniner. I tillegg er det også vist fosforylering av "site spesific focal adhesion kinase" (FAK), aktivering av GTPase og barriereregulering i lungeendotelceller hos mennesker<sup>62</sup>. Videre mikroskopiske observasjoner viste at FAK har en tendens til å grupperes med vitronectin reseptorer<sup>64</sup>. Denne assosiasjonen har en potensiell funksjonell viktighet, da stimulering av vitronectin reseptorer initierer en endotelavhengig dilatasjon av arterier, men dette er fremdeles ikke helt kartlagt<sup>63</sup>.

## Endotel dysfunksjon og patogenese

Som nevnt tidligere frigir endotel nitrogenoksid, som produseres intracellulært av endotelial nitrogenoksid syntase (eNOS). Dette gjør den i respons til flere stimuli, blant annet økte skjærekrefter.

Dysfunksjon av vaskulært endotel har vært vist blant annet hos pasienter med aterosklerose, og aterosklerose-assosierte sykdommer, og er derfor tilstede tidlig ved aterogenesen. NO induserer vasodilatasjon, men ved siden av dette har den en del funksjoner som kan virke protektivt mot aterosklerose. Den forhindrer blant annet adhesjonen av leukocytter og deres migrasjon inn til arterieveggen, proliferasjon av vaskulære glatte muskelceller og plateadhesjon og aggregering. Balansen mellom blodstrøm og trombe-dannelse, er også en viktig oppgave som utføres av vaskulær endotel. Det er blitt vist at NO og prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), inhiberer plate-aktivering.

Dermed har endotel dysfunksjon en stor rolle i patogenesen til kardiovaskulær sykdom, og de fleste risikofaktorene som forbindes med hjerte- og karsykdom har en direkte innvirkning på endotel dysfunksjonen. Videre følger en oversikt over de viktigste risikofaktorene og tilstandene som fører til endotel dysfunksjon.

### **Tobakksrøyk**

Sammenhengen mellom kardiovaskulær morbiditet/mortalitet og røyking har vært kjent i mer enn 50 år. En rapport fremlagt av WHO anslår røyking som den fjerde største globale trusselen mot helse.

Røyking utsetter det vaskulære systemet for en uttalt fysiologisk stress, som blant annet reduserer blodstrømmen i koronarkar. Dette fører til regionale forstyrrelser i myokard-perfusjonen. Andre mekanismer som spiller inn hos røykere er økt aktivering av trombocytter og leukocytter, samt uønskede effekter på lipider, blodtrykk og insulinresistens.

Direkte skade på endotel forårsaket av tobakksrøyk har en avgjørende betydning for utviklingen av flere hjerte- og karsykdom. Endotelceller utsatt for tobakksrøyk har et endret utseende i form av en endring i membran-arkitekturen og man får dermed en merkbar endring i funksjon. Dette inkluderer redusert aktivitet av eNOS, økt ekspresjon av adhesiner og dysregulering av lokal trombocytbalanse<sup>66,67</sup>.

Sigarettrøyk inneholder blant annet frie oksygenradikaler som skader endotelceller på forskjellige måter. Flere studier har vist et doseavhengig fall i endotelavhengig vasodilatasjon i perifer og koronar sirkulasjon hos røykere<sup>68</sup>.

Det har også blitt vist at koronar mortalitet er mye lavere i Sør-Europa sammenlignet med Nord-Europa selv om det er lik prevalens av røyking. Dette forklares blant annet med at en



middelhavsdiett er mye rikere på antioksidanter og omega-3 fettsyrer, noe som kan ha sammenheng med den lavere mortaliteten. Omega-3 fettsyrer synes å ha en protektiv effekt mot endotel dysfunksjon hos røykere<sup>69</sup>.

### ***Dyslipidemi***

Hyperkolesterolemi er assosiert med endotel dysfunksjon. LDL er en viktig mediator for endotelskade. Assosiasjonen viser også en redusert nitrogenoksid tilgjengelighet i koronararterier<sup>70</sup>.

Familiær hyperkolesterolemi er assosiert med utvikling av endotel dysfunksjon før klinisk arteriell sykdom manifesteres. Hos barn med familiær hyperkolesterolemi er totalkolesterol og lipoprotein-A konsentrasjoner omvendt korrelert til graden av flow-mediert dilatasjon (FMD)<sup>71</sup>.

### ***Hypertriglyceridemi***

Innvirkningen av hypertriglyceridemi på endotelfunksjon er usikker. I forsøk hos pasienter med kronisk hypertriglyceridemi, var det svekket vasodilatasjon i underarmen ved serotonin stimuli, men uendret ved acetylcholin<sup>72,73</sup>. FMD i arteria brachialis var også redusert hos unge menn med hypertriglyceridemi<sup>74</sup>, mens akutt administrasjon av triglycider til normale individer ikke hemmet FMD<sup>72,74,75</sup>. Et viktig poeng er at pasienter med hypertriglyceridemi ofte også har insulinresistens, og at det er insulinresistensen som mest sannsynlig fører til endotel-dysfunksjonen<sup>76</sup>.

Det sies også at HDL kolesterol kan påvirke endotelfunksjon uavhengig av LDL kolesterol<sup>77</sup>. Effekten av statiner hos pasienter med hyperkolesterolemi har vist en bedring av endotelfunksjon i koronar og underarms-sirkulasjon. Andre intervensjoner som for eksempel kostholdsregulering har også vist å bedre endotelfunksjon.

Statiner kan bedre endotelfunksjon via kolesterol-uavhengige mekanismer, spesielt gjennom deres antiinflammatoriske og antioksidative egenskaper. Bedring av endotelfunksjon ved hjelp av statiner og andre intervensjoner viser at det er en sammenheng mellom dyslipidemi og endotel-dysfunksjon.

## ***Hyperhomocysteinemi***

Hyperhomocysteinemi har de senere år blitt betraktet som en kardiovaskulær risikofaktor. De fleste pasienter har en mild form, men ca 1 % har alvorlig hyperhomocysteinemi. Den alvorlige formen skyldes oftest arvelig defekt i homocystein nedbrytningen, mens mild hyperhomocysteinemi oftest skyldes et lavt inntak av vitaminer og genetisk predisposisjon. Eksperimentelle studier har vist at mild hyperhomocysteinemi kan påvirke funksjonen og levedyktigheten til endotelceller og indusere endotel-dysfunksjon<sup>78</sup>, selv om det er noe uenighet om dette<sup>79</sup>.

Hyperhomocysteinemi kan forårsake endotel-dysfunksjon gjennom flere mekanismer. Blant annet vasorelaksasjon og hemmet akkumulering av cGMP i respons til acetylcholin i aorta hos mus med hyperhomocysteinemi. Endringene som forårsaket hyperhomocysteinemi medførte en paradoksall vasokonstriksjon og økt produksjon av det potente reaktive oksygenradikalet superoksid,  $O_2^-$ . Derfor tror man at denne auto-oksidasjonen av homocystein med påfølgende dannelse av  $O_2^-$  er den underliggende mekanismen til endotelskade.  $O_2^-$  reagerer med NO og danner peroksnitrat som angriper tyrosin-reststoffer på proteiner<sup>80</sup>.

NOS inhibitoren ADMA (asymmetric dimethylarginine) kan også reagere med reaktive oksygenradikaler og forårsake endotel-dysfunksjon hos pasienter med hyperhomocysteinemi. Homocystein inhiberer enzymet som degraderer ADMA. Dette medfører en akkumulasjon av ADMA som kan redusere tilgjengeligheten av nitrogenoksid hos pasienter med homocysteinemi<sup>81,82</sup>.

Det er også vist at homocystein øker adhesjonen av monocytter og T-celler til endotelceller i human aorta. Den forbedrer også ekspresjonen av adhesjonsmolekyler på endoteloverflaten. Disse effektene involverer proinflammatoriske og oksidative mekanismer, slik at de forsvinner ved preinkubasjon med COX-hemmere og antioksidanter. Aterosklerose og den økte ekspresjonen av adhesiner ble reversert ved korreksjon av hyperhomocysteinemi. Dette ble gjort ved å gi kosttilskudd med folat, vitamin B<sub>6</sub> og B<sub>12</sub>, noe som viser en direkte patogen rolle av hyperhomocysteinemien.

For å summere kan homocystein indusere oksidativ stress og ha andre effekter på endotel. Reaktive oksygenradikaler reduserer tilgjengeligheten av nitrogenoksid, noe som fører til endotel dysfunksjon, som igjen kan gi opphav til aterosklerose.

## ***Diabetes mellitus***

Kardiovaskulær sykdom er hovedkompliseringen til diabetes, spesielt type 2. Det faktum at mange kardiovaskulære risikofaktorer er tilstede lenge før utviklingen av diabetes, har ført til økende støtte om en "common ground"-hypotese, hvor type 2 diabetes og kardiovaskulær sykdom deler felles genetiske og miljømessige faktorer<sup>83</sup>. De cellulære mekanismene som forbinder metabolsk syndrom, diabetes type 2 og aterosklerose er fortsatt uklare, men alle disse tilstandene har redusert nitrogenoksid bioaktivitet, altså endotel dysfunksjon.

Det har blitt vist at diabetes type 2 er forbundet med økt produksjon av reaktive oksygenradikaler<sup>84</sup>, og at antioksidanter kan bedre endotel dysfunksjon under eksperimentelle forhold<sup>84</sup>. Dette har ført til at man har hatt en spesiell interesse overfor oksidert LDL. Oksidert LDL hemmer endotel-avhengig relaksasjon mer enn vanlig LDL. LDL partikler hos pasienter med diabetes type 2 er mindre og mer tettpakket. De er også mer mottakelige for oksidasjon. Dette kan medføre at disse pasientene lettere utvikler aterosklerose<sup>85,86</sup>.

Unormale forhold i L-arginine/nitrogenoksid syntesen som fører til redusert nitrogenoksid bioaktivitet, kan være årsak til økt kardiovaskulær risiko hos pasienter med diabetes. Trolig er det forskjellige patologiske tilstander ved diabetes type 1 og type 2 som fører til endotel dysfunksjon, men det trengs mer forskning på dette området.

## ***Arteriell hypertensjon***

Endotel dysfunksjon er et generelt funn ved essensiell hypertensjon. Denne sammenhengen kjennetegnes ved svekket nitrogenoksid bioaktivitet forårsaket av reaktive oksygenradikaler. Ved redusert nitrogenoksidtilgjengelighet er det andre mekanismer som for eksempel hyperpolarisering som står for den endotel-avhengige vasodilatasjonen<sup>87</sup>.

En interaksjon mellom nitrogenoksid og ET-1-systemet kan være medvirkende i patogenesen til endotel dysfunksjon. Selv om det ikke er konkluderende bevis på økte plasmakonsentrasjoner av ET-1 ved essensiell hypertensjon, øker aktiviteten til denne vasokonstriktoren ved redusert tilgjengelighet av nitrogenoksid<sup>88</sup>. Ved lavere nitrogenoksidnivåer vil dette føre til at den inhibitoriske effekten som nitrogenoksid har på ET-1-produksjon gjennom ET<sub>B</sub>-reseptorer (se ovenfor), bli mindre. Denne ubalansen mellom disse to systemene kan øke den vasokonstriktoriske aktiviteten til ET-1<sup>89,90</sup>.

Den svekkede endotel-avhengige vasodilatasjonen ved essensiell hypertensjon har ofte blitt betraktet som den sentrale mekanismen i blodtrykksøkning, eller opprettholdelse av høyt blodtrykk. Imidlertid vet man at endotel dysfunksjon ikke bare er spesifikk for essensiell hypertensjon, men et kjennetegn for alle store kardiovaskulære risikofaktorer og fordi det ikke er en klar sammenheng mellom graden av endotel dysfunksjon og blodtryksverdier. Dette har ledet til at man tenker at det kan være en "common ground" som bestemmer

mottagelighet for endotel dysfunksjon, aterosklerose og hendelser hos pasienter med kardiovaskulære risikofaktorer. Hos pasienter med hypertensjon, vil en redusert underarms-respons til acetylcholin korrelere med intima-media fortykkelse i carotisarteriene<sup>91</sup>. Hos normotensive pasienter viste acetylcholine responsen i epicardiale koronararterier en invers korrelasjon med intramurale plakk<sup>92</sup>. Det trengs mer forskning for å fastslå et direkte forhold mellom endotel dysfunksjon og kardiovaskulære hendelser hos pasienter med hypertensjon.

Ved hypertensjon, kan endotel dysfunksjon reverseres både farmakologisk og ikke-farmakologisk. Fysisk aktivitet kan forbedre endotel-avhengig vasodilatasjon i mikrosirkulasjonen i underarmen<sup>93</sup>, mens antihypertensive medikamenter viser forskjellige resultater.

Det er veldig få og ikke-entydige bevis for at  $\beta$ -blokkere påvirker endotelfunksjonen. Kalsium antagonist, og spesielt amlodipin, reverserte konsekvent nedsatt endotelavhengig vasodilatasjon, men det var motstridende resultater i arteria brachialis. ACE-hemmere forbedret endotelfunksjon i subkutane arterier, epicardialt, renalt og brachialt, men de bedret ikke den nedsatte responsen av acetylcholine i underarmen. Lignende resultater finnes for angiotensin II reseptor antagonist.

Den kliniske relevansen av endotel dysfunksjon ved hypertensjon trenger mer forskning som dokumenterer at reversering med behandling forbedrer prognosen. Uten slik forskning, kan ikke vurdering av endotel dysfunksjon inkluderes i en klinisk evaluering for å definere kardiovaskulær risiko eller vurderes som et terapeutisk mål hos pasienter med essensiell hypertensjon.

## ***Cerebrovaskulær sykdom***

Evaluering av endotelfunksjon i cerebrale kar er foreløpig ikke mulig hos mennesker og all data som er tilgjengelig er i hovedsak fra dyremodeller.

Det er blitt postulert at hos mennesker kan koronar endotel dysfunksjon være assosiert med økt risiko for cerebrovaskulære hendelser<sup>94</sup>. Det er også spekulert i om koronar endotel dysfunksjon er veldig lik dysfunksjonen som oppstår i cerebrale kar. Endotel dysfunksjonen kan forårsake ischemisk hjerneinfarkt på grunn av dysfunksjonens proaterotrombotiske virkning.

Når det gjelder hemorragisk infarkt, er det blitt argumentert med at cerebral blødning kan oppstå som følge av tidligere ischemisk skade på cerebrale arterioler på grunn av forlenget vasospasme<sup>95</sup>. Det er også mulig at vasokonstriksjon i forbindelse med cerebrovaskulær endotel-skade kan forårsake fysisk ruptur av skadde cerebrale kar.

## Overvekt

Ved vurdering av effekten av endotel dysfunksjon hos overvektige, skiller man ofte mellom dysfunksjon i motstandsarterier og de noe større tilførende arteriene. I motstandsarteriene har man hos klinisk overvektige funnet en reduksjon i vasodilatasjon i respons til intra-arteriell infusjon av muskarinagonister, men disse funnene er ikke konsistente<sup>96</sup>. Ved målinger av blodstrøm i leggen med PET-scan, viste man at det var nødvendig med dobbelt så mye infusjon av bradykinin for å indusere en vasodilatasjon som var 70 % av den man finner hos slanke individer<sup>97</sup>. I en annen studie var blodstrøms-responsen til metacholin i leggen likt redusert hos overvektige med eller uten diabetes type2, men endotel-uavhengig vasodilatasjon var normal.

Når det gjelder mekanismene som er ansvarlige for endotel-dysfunksjon hos overvektige i motstandsarterier, er det ingen bevis som tyder på at den reduserte responsen av muskarin agonister avhenger av svekket nitrogenoksyd syntese. Endotel dysfunksjonen ble bare delvis restaurert med enten vitamin C eller NSAIDs, noe som tyder på at deler av defekten kan tilskrives reaktive oksygenradikaler eller COX-produkter, eller begge<sup>98</sup>. I andre studier har det kommet frem at ubalanse i ET-1 tonus bidrar til dårligere endotel-avhengig dilatasjon hos overvektige<sup>99</sup>.

Studier med vektreduksjon gir andre viktige ledetråder. Kostholdsregulert vektreduksjon alene hadde ikke signifikant påvirkning på motstandsarterier. Effekten var mer konsistent med enten trening eller midler som hemmer fettabsorpsjon<sup>100-102</sup>. Med hemmet fettabsorpsjon var den forbedrete vaskulære reaktiviteten korrelert med endring i LDL kolesterol. I den andre studien hvor det både var kostholdsregulert og treningsregulert vekt nedgang, var forbedringen relatert til endring i plasma insulin konsentrasjon.

Når det gjelder de større tilførende arteriene har en stor reduksjon av FMD i a. brachialis og a. femoralis med bevart respons til nitrater vist seg hos individer med ukomplisert overvekt<sup>103</sup>. Alle studier viste sterkere korrelasjon til abdominal fedme i motsetning til generalisert overvekt. Vektreduksjon med kosthold og trening forbedret FMD proporsjonalt med vektendring, uavhengig av diabetes eller redusert glukosetoleranse<sup>104</sup>.

Sammenfatningsvis har endotel dysfunksjon hos overvektige blitt dokumentert i motstandsarterier og større tilførende arterier i forskjellige karsegmenter uavhengig av andre komorbiditeter. Endotel dysfunksjonen kan tilskrives blant annet reaktive oksygenradikaler, COX overreaktivitet, økt ET-1 tonus og økt insulinresistens. Vektreduksjon kun på basis av kosthold har marginale effekter sammenlignet med kosthold i kombinasjon med trening eller kosthold i kombinasjon med fettabsorpsjons hemmende medikamenter.

## ***Angina pectoris***

Endotel dysfunksjon i koronararteriene ligner generalisert endotel dysfunksjon. Hemmet endotel-avhengig dilatasjon er assosiert med myokard ischemi<sup>105</sup>. Normalt pleier koronar arteriediameter å øke ved trening, da hovedstimulus for nitrogenoksid utslipp er økt blodføring. Men paradoksalt nok leder økt blodføring i koronararterier til vasokonstriksjon hos pasienter med angina pectoris, trolig via  $\alpha$ -adrenerge mekanismer.

Acetylcholin kan også fremkalle paradoksalt vasokonstriksjon i aterosklerotiske koronar arterier gjennom aktivisering av muskarine reseptorer på vaskulære glatte muskelceller<sup>106</sup>.

Endotel-avhengig vasodilatasjon i underarmen er sterk korrelert med dilatasjon i koronarsirkulasjonen. Dette kan reflektere en "common ground", som en genetisk predisposisjon for endotel-dysfunksjon og kardiovaskulær sykdom<sup>107</sup>. Dette uttrykkes på bakgrunn av forskjellige genetiske varianter av eNOS genet som kan lede til endotel-dysfunksjon.

Mange medisiner kan forbedre hemmet nitrogenoksid syntese hos pasienter med angina. En kan øke ekspresjonen av eNOS, øke bioaktiviteten av nitrogenoksid eller øke effektiviteten på målceller som for eksempel glatte muskelceller eller trombocytter.

Statiner forbedrer endotel-dysfunksjon hos pasienter med både stabil og ustabil angina<sup>108</sup>. Denne forbedringen skyldes bedret biotilgjengelighet av nitrogenoksid som følge av en oppregulering av eNOS og endinger i NAD(P) oksidase systemet<sup>109</sup>.

ACE-hemmere bedrer endotel-dysfunksjon hos pasienter med angina, muligens fordi ACE-hemmere forstyrrer nedbrytningen av bradykinin, som stimulerer nitrogenoksid utslipp. ACE-hemmere har også antioksidative egenskaper<sup>110</sup>.

Endoteldysfunksjon i koronarkar har altså funksjonelle og prognostiske implikasjoner. Stimuli for nitrogenoksidfrigivelse kan lede til en paradoksalt koronar vasokonstriksjon. Den sterke relasjonen mellom endotel-avhengige responser i koronarkar og underarmen kan reflektere en felles genetisk predisposisjon både for endotel dysfunksjon og kardiovaskulær sykdom. Flere farmakologiske strategier kan forbedre nedsatt nitrogenoksid syntese hos pasienter med angina pectoris.

## **Hjertesvikt**

Økt vasokonstriksjon og redusert vasodilatasjon i repons til fysisk aktivitet er hemodynamiske kjennetegn av hjertesvikt, og endotelet spiller en viktig rolle i disse abnormalitetene.

Nedsatt vasodilatasjon i respons til acetylcholin kom frem i mikrosirkulasjonen i myokard, tykkleggen og underarmen, noe som tyder på at nitrogenoksidmediert endoteldysfunksjon er et generalisert fenomen ved hjertesvikt<sup>111</sup>. Dyreeksperimenter tyder på at endotel dysfunksjon er en progressiv, tidsavhengig prosess som spiller en liten rolle i hjertesviktens startfase, men får en større rolle senere i forløpet.

Mekanismene bak redusert nitrogenoksid-avhengig vasodilatasjon hos pasienter med hjertesvikt kan være redusert eNOS aktivitet. En unormal respons til acetylcholin kan også skyldes en defekt i muskarine reseptorer.

Acetylcholinindusert dilatasjon i underarmens motstandskar var redusert hos pasienter med hjertesvikt, men responsen til substans P var normal. Substans P virker via en annen reseptor og har ingen direkte effekt på vaskulære glatte muskelceller. Lignende resultater er rapportert i koronarkar hos hjertesviktpasienter<sup>112</sup>. Kronisk hjertesvikt kan derfor være assosiert med spesifikk reseptor abnormalitet på muskarine reseptorer, post-reseptor mekanismer, eller begge deler.

Økte konsentrasjoner av cytokiner kan også være involvert i endotel dysfunksjon hos hjertesviktpasienter, som for eksempel TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  reduserer eNOS mRNA i endotelceller<sup>113</sup>, øker superoksid produksjon via glatte muskelceller som minker nitrogenoksid konsentrasjoner<sup>114</sup>. Hemmede FMD-responser hos hjertesviktpasienter blir bedre med intra-arteriell og langvarig oral administrasjon av vitamin C<sup>115</sup>, noe som igjen indikerer at reaktive oksygenradikaler hemmer nitrogenoksidavhengig vasodilatasjon.

Plasmakonsentrasjoner av ET-1 er to- til tredoblet hos pasienter med NYHA klasse III-IV hjertesvikt, og denne økningen korrelerer med omfanget av hemodynamisk svekkelse og sier noe om mortalitet<sup>116</sup>. Intravenøs infusjon av ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> reseptor antagonist, økte hemodynamikken signifikant<sup>117</sup>, noe som bekrefter rollen til endogen ET-1-mediert vasokonstriksjon hos hjertesviktpasienter.

Hjertesvikt er assosiert med endotel dysfunksjon. Mye av dette kan skyldes redusert nitrogenoksid biotilgjengelighet, men de eksakte mekanismene er fremdeles ikke helt kartlagte. Det trengs mer forskning med endotelin reseptor antagonist hos hjertesviktpasienter.

## ***Erektile dysfunksjon***

Erektile dysfunksjon affiserer rundt 100 millioner menn verden rundt. Endotel dysfunksjon i arteriene og venene som forsyner penis er hovedårsaken, og står for ca. 80 % tilfellene<sup>119</sup>.

Erektile dysfunksjon er vanlig hos pasienter med langtkommen aterosklerose<sup>118</sup>. Det er også mange relativt unge menn som ikke har en annen form for annen sykdom, men som har erektil dysfunksjon, noe som kan bety at dette kan være en av de første manifestasjonene til en systemisk vaskulær sykdom. Det ble også vist at menn med erektil dysfunksjon hadde redusert FMD og vasodilatasjon i arteria brachialis i respons til glyceryl trinitrat sammenlignet med kontrollgruppen. Det er derfor av stor interesse at man prøver å belyse om disse individene utvikler prematur kardiovaskulær sykdom, og om det er noen variasjoner i gener som involverer nitrogenoksid og cGMP systemet.

Medisiner som hemmer nedbrytningen av cGMP, er effektive i behandlingen av erektil dysfunksjon, noe som styrker tanken om et bindeledd mellom cGMP-systemet og erektil dysfunksjon. Det er uklart om langtidsbehandling med disse medikamentene kan rette på endotel dysfunksjon. Eksempler på medikamenter er sildenafil, tadalafil og vardenafil.



## Flow-mediert dilatasjon (FMD)

Når blodføringen gjennom en blodåre øker, får vi en reaktiv dilatasjon av karet. Dette fenomenet kalles flow-mediert dilatasjon og ble først beskrevet av Schretzenmayer i 1933<sup>120</sup>. Etter denne beskrivelsen har flere studier pekt på denne parameterens kliniske signifikans for å være en mulig prediktor for endotelfunksjon, og dermed også kardiovaskulær patologi. Endotelets rolle i flow-mediert dilatasjon ble først påvist i arteria femoralis<sup>121,122</sup>, og epikard arterier<sup>123,124</sup>. Som nevnt tidligere er det økte skjærekrefter som fører til denne dilatasjonen. Disse skjærekreftene kommer av det viskøse draget av blod over endotelcellene og kraften virker perpendikulært på karetets lengdeakse<sup>1</sup>. Endotelet virker som en mekanotransduser som omdanner disse skjærekreftene til vasodilatasjon via forskjellige mediatorer, som beskrevet tidligere.

Et annet poeng med denne aktiveringen av eNOS, er at til tross for økning i skjærekrefter vil konsentrasjonen av NO på karetets lumenale side opprettholdes<sup>125</sup>. Via forsøk har man funnet ut at FMD etter korte hyperemiske episoder nesten utelukkende er mediert av NO, mens etter lengre perioder med hyperemi virker det som om FMD ikke er NO-mediert<sup>126</sup>.

FMD-responsen er ikke kun avhengig av den absolutte økningen av skjærekrefter men også forandringen per tidsenhet<sup>127</sup>. Videre er det en rekke faktorer som spiller inn på FMD, som f.eks ekstracellulært kalsium og natrium<sup>128</sup>, magnesium<sup>129</sup>, inntak av fettrik måltid<sup>130</sup>, psykisk stress og katekolaminer<sup>131</sup>, fysisk aktivitet<sup>132</sup>, serumnivåer av østrogen og progesteron<sup>133</sup>, røyking<sup>134</sup> og akutte glukoseforandringer<sup>135</sup>.

Hos mennesker er FMD for det meste studert i arteria brachialis og i koronarsirkulasjon. Dog er målinger i koronarsirkulasjonen en invasiv metode, slik at målinger i arteria brachialis blir ofte brukt som et uttrykk for FMD i hele karsystemet, og fungerer derfor i klinisk sammenheng som en erstatning for målingene i koronarsirkulasjonen<sup>136,137</sup>. Denne sammenhengen er fremdeles ikke helt sikkert påvist og er gjenstand for diskusjon<sup>138,139</sup>, da antallet pasienter innlemmet i slike studier antakelig har vært for lite til å si noe konklusivt.

Tidligere har vi belyst sammenhengen mellom endotel dysfunksjon og kardiovaskulære risikofaktorer relatert til flere sykdomsprosesser, som f.eks hyperlipidemi, arteriell hypertensjon og diabetes mellitus. Flere studier har også vist at endotel dysfunksjonen ved koronarsykdom kan være reversibel<sup>140,141</sup>, dette har muligens banet vei for at utviklingen av aterosklerose kan bremses.

Per dags dato er denne parameteren best egnet til å vurdere akutte endringer i endotelfunksjon i mennesker. Siden så mange faktorer spiller inn i FMD, er det viktig å ha klare målemetoder og standardisere den pre-analytiske variasjonen. Dette betyr i praksis at slik situasjonen er i dag, egner FMD seg mest som en parameter for å følge et enkelt individ over tid, under standardiserte forhold.

Mye er fremdeles ikke kartlagt i forhold til FMD, både hva angår målinger, prognostisk verdi og klinisk signifikans. For å kunne bruke FMD som en prognostisk indikator er vi avhengig av klare retningslinjer og referanseverdier utformet ved hjelp av studier på store pasientgrupper. En kan tenke seg at slike referanseverdier trengs for de forskjellige sykdomsprosessene hvor endotel dysfunksjon spiller inn. I tillegg vet vi at FMD påvirkes av mange faktorer, og disse må også tas i betraktning ved utforming av slike referanseverdier, som bør være standardisert mellom forskjellige laboratorier og ikke minst internasjonalt.

Nylig har et nytt analysesystem blitt introdusert. Dette vil automatisk detektere tunica-intima overgangene, og dermed minske variabiliteten i målingene av kardiameter, samt redusere analysetid<sup>142</sup>. Slike fremskritt vil bidra til en framtidig standardisering av denne parameteren, slik at den ikke bare vil være en biomarkør, men en verdifull erstatning for endotel dysfunksjon i rutinemessige kliniske undersøkelser.

## DEL 2 – EKSEMPEL PÅ REGISTRERING AV FMD

Celermajer introduserte i 1992 en metode for bruk av høyfrekvent ultralyd bildetakning til å vurdere endotelavhengig flow-mediert dilatasjon (FMD)<sup>143</sup>. Dette var en noninvasiv teknikk som stimulerte til utslipp av nitrogenoksider fra endotel som deretter ledet til vasodilatasjon som senere kunne brukes som en indeks for vasomotorfunksjon, og dermed også et mål på endotelets funksjon. Vi har i oppgavens første del tatt for oss disse funksjonene og belyst hvordan de henger sammen med og påvirker flere sykdomstilstander. I denne delen skal vi beskrive hvordan en slik måling systematisk kan gjennomføres, før vi tilslutt presenterer våre egne målinger og resultater.

### Metode

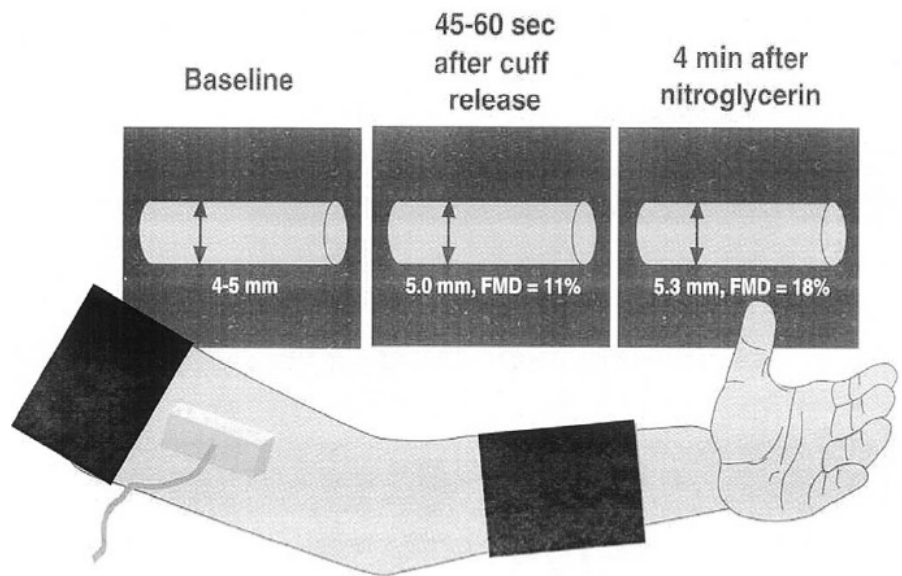
Flere faktorer har innvirkning på FMD, blant annet romtemperatur, mat, medikamenter og sympatisk stimuli<sup>144-146,139</sup>. Derfor er det viktig å standardisere miljøfaktorene før en slik måling gjennomføres:

1. Faste i helst 8-12 timer før forsøk
2. Utføres i et rolig rom uten forstyrrende aktivitet
3. Stabil temperatur/temperaturkontrollert rom
4. Vasoaktiv medisin skal ikke tas i perioden 4 halveringstider før forsøk, om mulig.
5. Ikke fysisk aktivitet i timene før forsøk
6. Avstå fra kaffe, fettrik diett, vitamin C, tobakk 4-6 timer før forsøk
7. Registrer hvilken fase i menstruasjonssyklus kvinner befinner seg.

Målingene gjennomføres med høyfrekvent, høykvalitets to-dimensjonell ultralydbilde der samtidig EKG måling benyttes for å bestemme bildets relative forhold til hjertesyklus<sup>147,148</sup>. Kandidaten ligger komfortabelt med armene supinert i anatomisk grunnstilling slik at man kan gjennomføre en lengdesnittsavlesning av arteria brachialis proksimalt for fossa cubitalis. Et område av arterien med velavgrenset tunica-intima ved både fremre og bakre vegg velges for kontinuerlig to-dimensjonal registrering, og anatomiske landmerker brukes for å holde bildet stabilt på dette området ut hele forsøket.

*Endotelavhengig FMD:* For å skape økt blodstrømhastighet inne i arterien brukes en blodtrykksmansjett på enten over- eller underarm i forbindelse med en reaktiv hyperemi-prosedyre. Overarms okklusjon gir høyere blodføring, og skjærekrefter, og dermed kraftigere dilatasjon av arterien, men er mer krevende da det gir mer artefakter i bildet<sup>149</sup>. En utgangsdiameter (baseline) registreres først, som man deretter bruker til å estimere blodføring i arteriesegmentet. Deretter pumpes mansjetten opp slik at man får en total okklusjon av arterien (systolisk trykk + 50 mmHg) i 5 minutter. Dette gir iskemi nedenfor okklusjonen og en dilatasjon av motstandskar i dette området. Når luften tømmes ut av

mansjetten får vi en reaktiv hyperemi og dermed økte skjærekrefter, og dette vil dilatere arteria brachialis (omtalt i oppgavens del 1). Blodstrømhastigheten registreres opp til 15 sek etter mansjetten tømmes. Diameterregistrering av arterien foregår kontinuerlig fra 30 sek før, til 120 sek etter at mansjetten tømmes<sup>150</sup>.



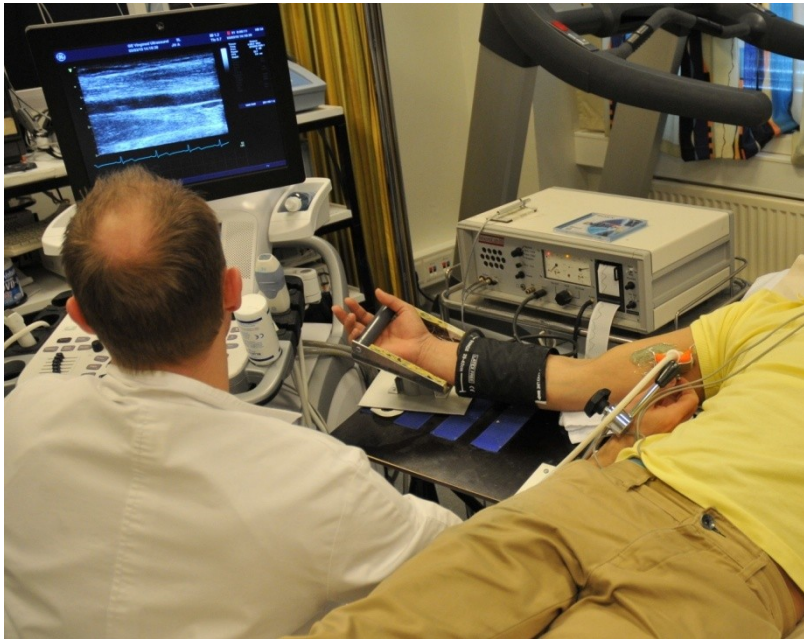
*Endoteluavhengig vasodilatasjon med nitroglycerin:* Etter okklusjonstesten er gjennomført skal kandidaten hvile i 10 minutter før man igjen får

*Figur 6. Dette bildet viser hvordan blodtrykksmansjetten kan plasseres på enten over- eller underarm når man ønsker å utløse en reaktiv hyperemi. Ultralydsondens plassering er også påtegnet. Figuren gir også en skjematisk fremstilling av når man kan forvente økning i kar-diameter som følge av hyperemi og eksogen tilførsel av nitroglycerin<sup>152</sup>.*

”baseline”-forholdene i arterien. En eksogen tilførsel av nitrogenoksid, i form av en høy dose (0.4 mg) nitroglycerin spray eller en sublingual tablett gis kandidaten for å utløse maksimal vasodilatasjon. Dette er et mål på den endoteluavhengige vasodilatasjonseffekten og gir et bilde av glatt muskelfunksjon i arterien. Maksimal vasodilatasjon oppnås 3-4 minutter etter nitroglycerininntak, og diameterregistrering skal utføres ut denne tiden<sup>151</sup> (Fig. 6).

## Resultat

Vi utførte målingene på en 24 år gammel frisk mann. Dermed trengte vi ikke å ta høyde for verken menstruasjonssyklus eller medikamenter. Videre var kandidaten fastende over natta og hadde ikke drevet fysisk aktivitet forut for målingene. Målingene ble foretatt i et undersøkelsesrom ved Sirkulasjonsfysiologisk seksjon, Oslo universitetssykehus HF, Aker, under så rolige og lite forstyrrende forhold som mulig. Da alle målingene ble foretatt i det samme rommet i samme økt, regner vi også temperaturen i rommet som konstant.



*Figur 7. Fotoet illustrerer utstyret og oppsettet vi benyttet for våre målinger. Til høyre på bildet kan man se ultralydsonden over høyre arteria brachialis, blodtrykksmansjetten ligger over underarmen.*

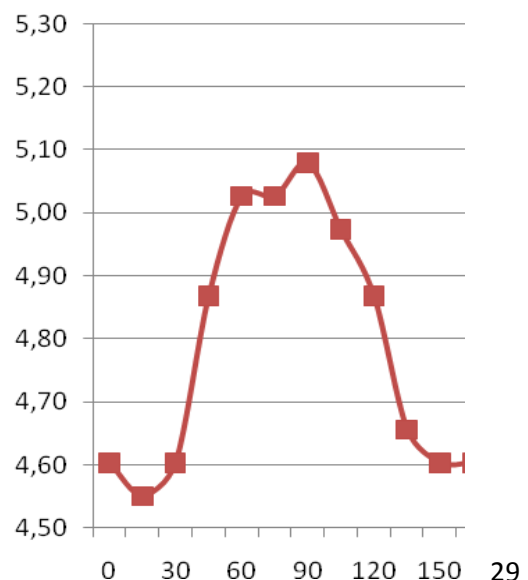
Ultralydapparatet vi brukte var av typen GE Vivid E9 farge dupleks skanner. Av praktiske grunner benyttet vi ikke målinger på forskjellige steder på arteriesegmentet, men holdt oss til et spesifikt område med tydelig markert tunica intima (Fig. 7). Baseline diameter av arterien ble sikret ved å gjøre gjentatte målinger på flere bilder, men på samme sted i arteriesegmentet mens armen var i hvile forut for okklusjonen. Vi fant at vi fikk mest nøyaktige målinger ved å benytte programmets funksjon til å

måle avstand i piksler og deretter omgjorde til millimeter med to desimaler. Selv om vi gjorde kontinuerlig opptak av arterien, valgte vi å fremstille resultatet med målinger omtrent hvert femtende sekund. Vi målte diameter utelukkende i endediastolen som var nærmest de 15-sekundsintervallene vi ønsket, og diastolen ble definert ut ifra den samtidige kontinuerlige EKG-registreringen.

Okklusjonstesten ble utført med blodtrykksmansjetten på underarmen, da dette gav minst forstyrrelser i bildet.

Endotelavhengig FMD:

Tid etter okklusjon (s)	Diameter (mm)
0 (baseline)	4,6
15	4,55
30	4,6
45	4,87
60	5,03
75	5,03
90	5,08
105	4,97
120	4,87
135	4,66
150	4,6
165	4,6



Blodføring i arterien før okklusjonen ble målt til 142 ml/min, mens blodføring like etter okklusjonen ble målt til 492 ml/min.

Etter okklusjonstesten lot vi kandidaten hvile i 10 minutter før vi under de samme forholdene og fremdeles liggende i samme posisjon tilførte pasienten en dose med nitroglycerin spray (0.4 mg) av typen Nitrolingual (Fig. 8). Til tross for kontinuerlig opptak av arteriediameteren begrenset vi igjen målingene av diameter til omtrent hvert femtende

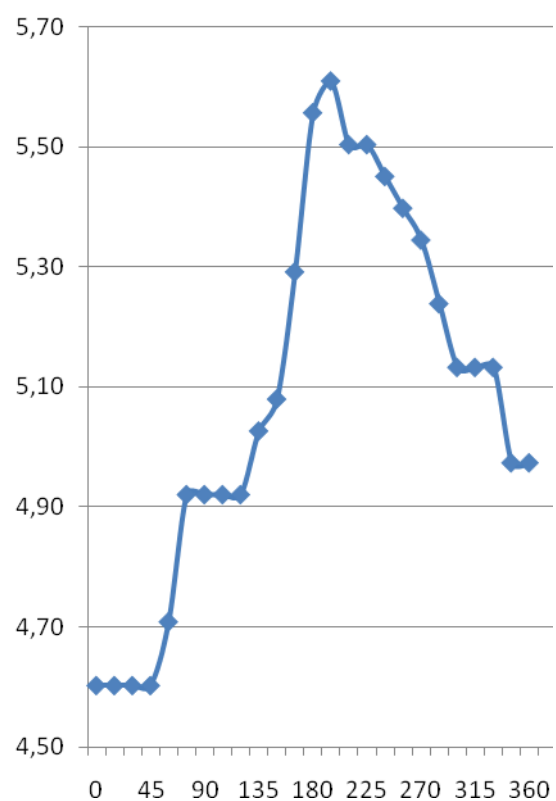


sekund, fremdeles utelukkende i nærmeste endediastole, og fortsatte i seks minutter, da vi regnet med at det ville ta lengre tid for den eksogene nitroglycerinens effekt å manifesteres.

*Figur 8. Fotoet illustrerer eksogen tilførsel av nitrogenoksid i form av en dose med nitroglycerin spray (0.4 mg) av typen Nitrolingual. Nederst i venstre hjørne vises ultralydsonden over høyre arteria brachialis.*

Endoteluavhengig vasodilatasjon:

Tid etter nitro (s)	Diameter (mm)
0 (baseline)	4,60
15	4,60
30	4,60
45	4,60
60	4,71
75	4,92
90	4,92
105	4,92
120	4,92
135	5,03
150	5,08
165	5,29
180	5,56
195	5,61
210	5,50
225	5,50
240	5,45
255	5,40
270	5,34
285	5,24
300	5,13
315	5,13
330	5,13
345	4,97
360	4,97





## Diskusjon/analyse

En nøyaktig måling av FMD er i stor grad avhengig av kvaliteten på ultralydbildet. For størst nøyaktighet bør man benytte et longitudinelt bilde av arterien hvor overgangen mellom lumen og tunica-intima er godt synlig både i karets fremre og bakre vegg. Dette sees best når ultralydsignalet kommer perpendikulært på arterien. For å minske variabiliteten i diametermålingene kan man også finne en gjennomsnittlig verdi ut ifra flere målinger på forskjellige steder på samme arteriesegment, dette valgte vi av praktiske grunner ikke å gjøre. En måling av diameter må også utføres på samme sted i hjertesyklus, da arterien strekkes under systolen som følge av økt trykk og volum generert av venstre hjertekammer. Dette er et uttrykk for arterieveggens ettergivelse og motvirkes best ved at diametermålinger gjøres utelukkende i diastolen, kontrollert av de samtidige kontinuerlige ekg-målingene. Begynnelsen av R-takken identifiserer endediastolen, mens toppen av T-bølgen identifiserer endesystolen (Fig. 9). Diametervurdering med hjelp av ultralyd er en teknisk krevende oppgave, og det anbefales minst 100 målinger under veiledning før man kan begynne å produsere gode nok målinger selv. Videre anbefales 100 målinger per år for å opprettholde kompetansen<sup>152</sup>.

Disse mulige feilkildene gjorde at vi i våre målinger søkte bistand hos dr. philos. Jonny Hisdal, med lang erfaring i ultralydundersøkelser. Vi gjorde diametermålinger av arterielumen omtrent hvert femtende sekund, og benyttet den samtidige EKG-registreringen for å sikre at målingene utelukkende ble foretatt i endediastolen.

Flere studier har vist at maksimal økning i diameter forekommer 60 sekunder etter okklusjonen er fjernet eller 45-60 sekunder etter maksimal reaktiv hyperemisk blodføring<sup>150,153</sup>. Denne økningen i diameter blir motvirket ved tilstedeværelsen av nitrogenoksid syntetase hemmeren N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginin, som tyder på at dette faktisk er en endotelavhengig prosess som er mediert av nitrogenoksid<sup>137,154</sup>. Dette forhold gjorde at vi passet på å registrere arteriediameter i nesten 3 minutter etter okklusjon. Mens etter nitroglycerin inntak registrerte vi hele 6 minutter, da vi visste at det ville ta litt tid før effekten av medikamentet viste seg<sup>151</sup>.



Figur 9. Illustrasjonen viser øverst et lengdesnitt gjennom høyre arteria brachialis. Den gule stiplede linjen viser dopplersignalets innfallsvinkel. Den røde stiplede boksen viser blodstrømsignalene i arterien som sammenfaller med EKG-registreringen under (blå).



At baseline diameter på kandidatens arteria brachialis var 4.6 mm gjorde karet velegnet til måling da arterier med mindre diameter enn 2.5 mm er svært vanskelig å måle, mens vasodilatasjon er vanskelig å bedømme i arterier som er større enn 5 mm i diameter<sup>153</sup>.

FMD uttrykkes gjerne som forandring i post-okklusjon diameter som prosent av baseline diameter<sup>136</sup>. Dette betyr at for enhver absolutt forandring i post-okklusjons diameter, vil en større baseline diameter, bety en mindre prosentvis forandring, og dermed en mindre FMD. I tillegg til dette vet vi at mindre arterier dilateres relativt mer enn større arterier, da skjærekreftene som virker på endotelet i et mindre lumen er større enn det i et stort lumen<sup>136</sup>. I tillegg til blodkarets baseline-diameter bør blodføringen i arterien og endring i blodføring etter okklusjon, også rapporteres. Det er denne økte hastigheten av blodet som gir økte skjærekrefter og dermed den endotelavhengige dilatasjonen (FMD). Blodføringen i arterien regnes ut automatisk ut av programmet på ultralydmaskinen etter denne formelen, når diameter av karlumen oppgis:

**Blodføring = tverrsnitt av lumen x middelhastigheten i en hjertesykklus =  $\pi \times \text{radius}^2 \times \text{middelhastigheten i en hjertesykklus}$**

Middelhastigheten av blodet gjennom en hjertesykklus kalkuleres ut ved hjelp av doppler ekkokardiografi, mens diameteren av lumen (radius x 2) måles med ultralyd.

Dette betyr at hvis FMD skal kunne sammenlignes mellom forskjellige individer er den mest nøyaktige måten i tillegg rapportere både baseline diameter, absolutt forandring i diameter og blodføring<sup>152</sup>.

Endotel-uavhengig dilatasjon er kun et mål på glatt muskelfunksjon i karet, og sier ingen ting om FMD, men det kan tenkes at endotel-avhengig dilatasjons diameter som prosent av endotel-uavhengig dilatasjons diameter kan brukes til å predikere noe om endotelets funksjon/dysfunksjon<sup>136</sup>. Mye litteratur tyder på at normalt er endoteluavhengig dilatasjon rundt 15 %, mens endotelavhengig dilatasjon kun er rundt 10 %<sup>1</sup>.

Baseline diameter = 4.60 mm

Aboslutt forandring = 5,08 mm – 4,60 mm = 0.48 mm

FMD = (5,08 mm – 4,60 mm) / 4,60 mm X 100 = 10,43 %

Blodføring før okklusjon = 142 ml/min

Blodføringa etter okklusjon = 492 ml/min

Endotel avhengig dilatasjons diameter som prosent av endotel-uavhengig dilatasjons diameter = 5.08 / 5,61 X 100 = 90,6 %

# Litteraturliste

- 1) Kelm M: *Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Jan, 282: H1-H5.
- 2) Geneser F (ed): *Histologi*. ISBN-10-8716101200, Muksgaard, 1990.
- 3) Florey: *The endothelial cell* Br Med J. 1966 August, 27; 2(5512): 487-490.
- 4) Moncada S et al.: *Antithrombotic properties of vascular endothelium* Lancet 1977 Nov, 19;2(8047):1075-6.
- 5) Furchgott RF: *Role of endothelium in response of vascular smooth muscle* Circ Res. 1983 Nov, 53(5):557-73.
- 6) Furchgott RF, Zawadzki JV: *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine* Nature. 1980 Nov, 27;288(5789):373-6.
- 7) Palmer RM et al.: *The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator* Hypertension. 1988 Oct, 12(4):365-72.
- 8) Pries AR, Secomb TW: *Microcirculatory network structures and models* Ann Biomed Eng. 2000 Aug, 28(8):916-21.
- 9) Bennett HS et al.: *Morphological classifications of vertebrate blood capillaries* Am J Physiol. 1959 Feb, 196(2):381-90.
- 10) Mikawa T, Fischman DA: *Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels* Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Oct, 15;89(20):9504-8.
- 11) Reese et al.: *Development of the coronary vessel system* Circ Res. 2002 Nov, 1;91(9):761-8.
- 12) Stewart PA, Wiley MJ: *Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras* Dev Biol. 1981 May, 84(1):183-92.
- 13) Janzer RC, Raff MC: *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells* Nature. 1987 Jan, 15-21;325(6101):253-7.
- 14) Aird WC et al.: *Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment* J Cell Biol. 1997 Sep, 8;138(5):1117-24.
- 15) Miller VM, Vanhoutte PM: *Endothelium-dependent responses in isolated blood vessels of lower vertebrates* Blood Vessels. 1986, 23(4-5):225-35.
- 16) Higashi N et al.: *Micromorphological characteristics of hepatic sinusoidal endothelial cells and their basal laminae in five different animal species* Okajimas Folia Anat Jpn. 2002 Dec, 79(5):135-42.
- 17) Kjellstrom BT et al.: *Comparison of oxidative metabolism in vitro in endothelial cells from different species and vessels* J Cell Physiol. 1987 Sep, 132(3):578-80.
- 18) Graier WF et al.: *Mechanisms of L-NG nitroarginine/indomethacin-resistant relaxation in bovine and porcine coronary arteries* Br J Pharmacol. 1996 Nov, 119(6):1177-86.
- 19) Houser SL et al.: *Constitutive expression of major histocompatibility complex class II antigens in pulmonary epithelium and endothelium varies among different species* Transplantation. 2004 Feb, 27;77(4):605-7.
- 20) Miller S et al.: *Selenoprotein expression in endothelial cells from different human vasculature and species* Biochim Biophys Acta. 2002 Oct, 9;1588(1):85-93.
- 21) Ballabh P et al.: *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications* Neurobiol Dis. 2004 Jun, 16(1):1-13.
- 22) Risau W: *Differentiation of endothelium* FASEB J. 1995 Jul, 9(10):926-33.
- 23) Breier G et al.: *Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation* Development. 1992 Feb, 114(2):521-32.
- 24) Roberts WG, Palade GE: *Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated* Cancer Res. 1997 Feb, 15;57(4):765-72.
- 25) Braet F, Wisse E: *Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review* Comp Hepatol. 2002 Aug, 23;1(1):1.
- 26) Braet F et al.: *Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B* Hepatology. 1996 Sep, 24(3):627-35.
- 27) Gatmaitan Z et al.: *Studies on fenestral contraction in rat liver endothelial cells in culture* Am J Pathol. 1996 Jun, 148(6):2027-41.
- 28) McDonald DM: *Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli* Am J Physiol. 1994 Jan, 266(1 Pt 1):L61-83.
- 29) Seidel CL, LaRochelle J: *Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels* Circ Res. 1987 Apr, 60(4):626-30.

- 30) De Mey JG, Vanhoutte PM: *Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium* Circ Res. 1982 Oct, 51(4):439-47.
- 31) Kuo L et al.: *Coronary venular responses to flow and pressure* Circ Res. 1993 Mar, 72(3):607-15.
- 32) Nichols K et al.: *Distribution of nitric oxide synthase activity in arterioles and venules of rat and human intestine* Am J Physiol. 1994 Aug, 267(2 Pt 1):G270-5.
- 33) Mayrovitz HN et al.: *Leukocyte adherence in arterioles following extravascular tissue trauma* Microvasc Res. 1980 Nov, 20(3):264-74.
- 34) McEver RP et al.: *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies* J Clin Invest. 1989 Jul, 84(1):92-9.
- 35) Nagel T et al.: *Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells* J Clin Invest. 1994 Aug, 94(2):885-91.
- 36) Sato N et al.: *Roles of ICAM-1 for abnormal leukocyte recruitment in the microcirculation of bleomycin-induced fibrotic lung injury* Am J Respir Crit Care Med. 2000 May, 161(5):1681-8.
- 37) Busse R, Mülsch A: *Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin.* FEBS Lett. 1990 Jun, 4;265(1-2):133-6.
- 38) Kuchan MJ, Frangos JA: *Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells.* Am J Physiol. 1994 Mar, 266(3 Pt 1):C628-36.
- 39) Dimmeler S et al.: *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* Nature. 1999 Jun, 10;399(6736):601-5.
- 40) Osawa M et al.: *Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?.* J Cell Biol. 2002 Aug, 19;158(4):773-85. Epub 2002 Aug 12.
- 41) Everson WV et al.: *Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease.* Trends Cardiovasc Med. 2001 Aug, 11(6):246-50.
- 42) Feron O et al.: *Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase.* J Clin Invest. 1999 Mar, 103(6):897-905.
- 43) García-Cardena G et al.: *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90.* Nature. 1998 Apr, 23;392(6678):821-4.
- 44) Laughlin MH et al.: *Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree.* J Appl Physiol. 2001 Feb, 90(2):501-10.
- 45) Testa M et al.: *Modulation of vascular endothelial gene expression by physical training in patients with chronic heart failure.* Ital Heart J. 2000 Jun, 1(6):426-30.
- 46) Lückhoff A: *Release of prostacyclin and EDRF from endothelial cells is differentially controlled by extra- and intracellular calcium.* Eicosanoids. 1988 1(1):5-11.
- 47) Rosales OR et al.: *Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration through mobilization of intracellular and extracellular pools.* Biochem J. 1997 Sep, 1;326 ( Pt 2):385-92.
- 48) Morawietz H et al.: *Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells.* J Physiol. 2000 Jun, 15;525 Pt 3:761-70.
- 49) Wagner F et al.: *Nitric oxide inhalation modulates endothelin-1 plasma concentration gradients following left ventricular assist device implantation.* J Cardiovasc Pharmacol. 2004 Nov, 44 Suppl 1:S89-91.
- 50) Kuchan MJ, Frangos JA: *Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.* Am J Physiol. 1993 Jan, 264(1 Pt 2):H150-6.
- 51) Ziegler T et al.: *Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 May, 18(5):686-92.
- 52) Qiu Y et al.: *Interaction between wall shear stress and circumferential strain affects endothelial cell biochemical production.* J Vasc Res. 2000 May-Jun, 37(3):147-57.
- 53) Lange A et al.: *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C.* J Biol Chem. 1997 Oct, 24;272(43):27345-52.
- 54) Alonso-Galicia M et al.: *Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide.* Hypertension. 1997 Jan, 29(1 Pt 2):320-5.
- 55) Takeuchi T et al.: *Nitric oxide-mediated relaxation without concomitant changes in cyclic GMP content of rat proximal colon.* Br J Pharmacol. 1996 Mar, 117(6):1204-8.
- 56) Pohl U, de Wit C: *A Unique Role of NO in the Control of Blood Flow.* News Physiol Sci. 1999 Apr, 14:74-80.
- 57) Budel S et al.: *Homocellular conduction along endothelium and smooth muscle of arterioles in hamster cheek pouch: unmasking an NO wave.* Circ Res. 2003 Jul, 11;93(1):61-8. Epub 2003 Jun 5.
- 58) Hoepfl B et al.: *EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Sep, 283(3):H996-H1004.
- 59) de Wit C et al.: *Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice.* Circ Res. 2000 Mar 31, 86(6):649-55.
- 60) Ingber DE: *Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology.* J Cell Sci. 2003 Apr, 1;116(Pt 7):1157-73.

- 61) Rizzo V et al.: *Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Oct, 285(4):H1720-9. Epub 2003 Jun 19.
- 62) Shikata Y et al.: *Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells*. Exp Cell Res. 2005 Mar 10, 304(1):40-9. Epub 2004 Nov 26.
- 63) Fox RJ, Frame MD: *Arteriolar flow recruitment with vitronectin receptor stimulation linked to remote wall shear stress*. Microvasc Res. 2002 Nov, 64(3):414-24.
- 64) Li S, Kim M et al.: *Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem. 1997 Nov, 272(48):30455-62.
- 65) Rang, Dale: *Pharmacology*. sixth edition 2007.
- 66) Newby DE et al.: *Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction*. Circulation. 1999 Mar, 99(11):1411-5.
- 67) Newby DE et al.: *Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis*. Circulation. 2001 Apr, 103(15):1936-41.
- 68) Zeiher AM et al.: *Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function*. Circulation. 1995 Sep, 92(5):1094-100.
- 69) Leeson CP et al.: *Relationship between circulating n-3 fatty acid concentrations and endothelial function in early adulthood*. Eur Heart J. 2002 Feb, 23(3):216-22.
- 70) Quyyumi AA et al.: *Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P*. Circulation. 1997 Jan, 95(1):104-10.
- 71) de Jongh S et al.: *Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis. 2002 Jul, 163(1):193-7.
- 72) de Man FH et al.: *Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Mar, 20(3):744-50.
- 73) Chwieniczky PJ et al.: *Preserved endothelial function in patients with severe hypertriglyceridemia and low functional lipoprotein lipase activity*. J Am Coll Cardiol. 1997 Apr, 29(5):964-8.
- 74) Lundman P et al.: *Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine*. J Am Coll Cardiol. 2001 Jul, 38(1):111-6.
- 75) Gudmundsson GS et al.: *Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia*. Am J Cardiol. 2000 Feb, 85(3):381-5.
- 76) Jonkers IJ et al.: *Insulin resistance but not hypertriglyceridemia per se is associated with endothelial dysfunction in chronic hypertriglyceridemia*. Cardiovasc Res. 2002 Feb, 53(2):496-501.
- 77) Kuvin JT et al.: *A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression*. Am Heart J. 2002 Jul, 144(1):165-72.
- 78) Li N et al.: *Effects of homocysteine on intracellular nitric oxide and superoxide levels in the renal arterial endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Sep, 283(3):H1237-43.
- 79) Homocysteine Studies Collaboration. *Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis*. JAMA. 2002 Oct, 288(16):2015-22.
- 80) Eberhardt RT et al.: *Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia*. J Clin Invest. 2000 Aug, 106(4):483-91.
- 81) Sydow K et al.: *ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins*. Cardiovasc Res. 2003 Jan, 57(1):244-52.
- 82) Stühlinger MC et al.: *Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation. 2001 Nov, 104(21):2569-75.
- 83) Hu FB, Stampfer MJ.: *Is type 2 diabetes mellitus a vascular condition?* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Oct 1, 23(10):1715-6.
- 84) Chwieniczky PJ et al.: *Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes*. Diabetologia. 2000 Aug, 43(8):974-7.
- 85) Rossi GP et al.: *Antibodies to oxidized low-density lipoproteins and angiographically assessed coronary artery disease in white patients*. Circulation. 2003 Nov 18, 108(20):2467-72. Epub 2003 Oct 27.
- 86) Jacobs M et al.: *Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta*. Br J Pharmacol. 1990 May, 100(1):21-6.

- 87) Taddei S et al.: *Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients.* Circulation. 1999 Sep 28, 100(13):1400-5.
- 88) Schiffrin EL: *State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension.* Hypertension. 1999 Oct;34(4 Pt 2):876-81.
- 89) Taddei S et al.: *Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension.* Circulation. 1999 Oct 19, 100(16):1680-3.
- 90) Haynes WG, Webb DJ: *Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease.* J Hypertens. 1998 Aug, 16(8):1081-98.
- 91) Ghiadoni L et al.: *Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension.* Hypertension. 1998 Jul, 32(1):25-32.
- 92) Zeiher AM et al.: *Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis.* Circulation. 1994 Jun, 89(6):2525-32.
- 93) Higashi Y et al.: *Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide.* Circulation. 1999 Sep 14, 100(11):1194-202.
- 94) Targonski PV et al.: *Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events.* Circulation. 2003 Jun 10, 107(22):2805-9. Epub 2003 May 27.
- 95) Dickinson CJ: *Why are strokes related to hypertension? Classic studies and hypotheses revisited.* J Hypertens. 2001 Sep, 19(9):1515-21.
- 96) Tack CJ et al.: *Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone.* Diabetologia. 1998 May, 41(5):569-76.
- 97) Laine H et al.: *Insulin resistance of glucose uptake in skeletal muscle cannot be ameliorated by enhancing endothelium-dependent blood flow in obesity.* J Clin Invest. 1998 Mar, 1;101(5):1156-62.
- 98) Perticone F et al.: *Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C.* Diabetes. 2001 Jan, 50(1):159-65.
- 99) Mather KJ et al.: *Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes.* Diabetes. 2002 Dec, 51(12):3517-23.
- 100) Ziccardi P et al.: *Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year.* Circulation. 2002 Feb, 19;105(7):804-9.
- 101) Sciacqua A et al.: *Weight loss in combination with physical activity improves endothelial dysfunction in human obesity.* Diabetes Care. 2003 Jun, 26(6):1673-8.
- 102) Bergholm R et al.: *Lowering of LDL cholesterol rather than moderate weight loss improves endothelium-dependent vasodilatation in obese women with previous gestational diabetes.* Diabetes Care. 2003 Jun, 26(6):1667-72.
- 103) Brook RD et al.: *Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults.* Am J Cardiol. 2001 Dec, 1;88(11):1264-9.
- 104) Hamdy O et al.: *Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome.* Diabetes Care. 2003 Jul, 26(7):2119-25.
- 105) Suwaidi JA et al.: *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction.* Circulation. 2000 Mar 7, 101(9):948-54.
- 106) Ludmer PL et al.: *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.* N Engl J Med. 1986 Oct 23, 315(17):1046-51.
- 107) Rossi GP et al.: *The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study.* J Am Coll Cardiol. 2003 Mar, 19;41(6):930-7.
- 108) Treasure CB et al.: *Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease.* N Engl J Med. 1995 Feb 23, 332(8):481-7.
- 109) Laufs U et al.: *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors.* Circulation. 1998 Mar, 31;97(12):1129-35.
- 110) Mancini GB et al.: *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study.* Circulation. 1996 Aug, 1;94(3):258-65.
- 111) Anderson TJ et al.: *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations.* J Am Coll Cardiol. 1995 Nov, 1;26(5):1235-41.

- 112) Holdright DR et al.: *The effects of intracoronary substance P and acetylcholine on coronary blood flow in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* Eur Heart J. 1994 Nov, 15(11):1537-44.
- 113) Yoshizumi M et al.: *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life.* Circ Res. 1993 Jul, 73(1):205-9.
- 114) Gryglewski RJ et al.: *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.* Nature. 1986 Apr, 3-9;320(6061):454-6.
- 115) Hornig B et al.: *Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure.* Circulation. 1998 Feb, 3;97(4):363-8.
- 116) Cody RJ et al.: *Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure.* Circulation. 1992 Feb, 85(2):504-9.
- 117) Kiowski W et al.: *Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure.* Lancet. 1995 Sep, 16;346(8977):732-6.
- 118) Jensen J et al.: *The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients.* Am J Hypertens. 1999 Mar, 12(3):271-5.
- 119) Lue TF: *Erectile dysfunction.* N Engl J Med. 2000 Jun, 15;342(24):1802-13.
- 120) Schretzenmayer A: *über Kreislaufregulatorische Vorgänge an den grossen Arterien bei der Muskelarbeit* Pflügers Arch 1933, 232: S743-S748.
- 121) Pohl U et al.: *Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo* Hypertension. 1986 Jan, 8(1):37-44.
- 122) Rubanyi GM et al.: *Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor* Am J Physiol. 1986 Jun, 250(6 Pt 2):H1145-9.
- 123) Holtz J et al.: *Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition* J Cardiovasc Pharmacol. 1984 Nov-Dec, 6(6):1161-9.
- 124) Inoue T et al.: *Endothelium determines flow-dependent dilation of the epicardial coronary artery in dogs* J Am Coll Cardiol. 1988 Jan, 11(1):187-91.
- 125) Kelm M et al.: *Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow* iovasc Res. 1991 Oct, 25(10):831-6.
- 126) Mullen MJ et al.: *Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia* Circ Res. 2001 Feb, 2;88(2):145-51.
- 127) Niebauer J, Cooke JP: *Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress* J Am Coll Cardiol. 1996 Dec, 28(7):1652-60.
- 128) Bevan JA: *Flow regulation of vascular tone. Its sensitivity to changes in sodium and calcium* Hypertension. 1993 Sep, 22(3):273-81.
- 129) Shechter M et al.: *Oral magnesium therapy improves endothelial function in patients with coronary artery disease* Circulation. 2000 Nov, 7;102(19):2353-8.
- 130) Evans M et al.: *Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus* Circulation. 2000 Apr, 18;101(15):1773-9.
- 131) Ghiadoni L et al.: *Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans* Circulation. 2000 Nov, 14;102(20):2473-8.
- 132) Fukai T et al.: *Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training* Clin Invest. 2000 Jun, 105(11):1631-9.
- 133) Sorensen KE et al.: *Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function* Circulation. 1998 Apr, 7;97(13):1234-8.
- 134) Lekakis J et al.: *Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals* Am J Cardiol. 1997 Feb, 15;79(4):529-31.
- 135) Kawano H et al.: *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery* J Am Coll Cardiol. 1999 Jul, 34(1):146-54.
- 136) Anderson TJ et al.: *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations* J Am Coll Cardiol. 1995 Nov, 1;26(5):1235-41.
- 137) Lieberman EH et al.: *Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease* Am J Cardiol. 1996 Dec, 1;78(11):1210-4.
- 138) Anderson TJ et al.: *Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study)* J Am Coll Cardiol. 2000 Jan, 35(1):60-6.

- 139) Levine GN et al.: *Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease* Circulation. 1996 Mar, 15;93(6):1107-13.
- 140) Mancini GBJ et al.: *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study* Circulation. 1996 Aug, 1;94(3):258-65.
- 141) Treasure CB et al.: *Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease* N Engl J Med. 1995 Feb, 23;332(8):481-7.
- 142) Preik M et al.: *Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function* Ultraschall Med. 2000 Oct, 21(5):195-8.
- 143) Celermajer DS et al.: *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis* Lancet. 1992 Nov, 7;340(8828):1111-5.
- 144) Hashimoto M et al.: *Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle* Circulation. 1995 Dec, 15;92(12):3431-5.
- 145) Celermajer DS et al.: *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction* J Am Coll Cardiol. 1994 Nov, 15;24(6):1468-74.
- 146) Lieberman EH et al.: *Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women* Ann Intern Med. 1994 Dec, 15;121(12):936-41.
- 147) Stadler RW et al.: *New methods for arterial diameter measurement from B-mode images* Ultrasound Med Biol. 1996, 22(1):25-34.
- 148) Stadler RW et al.: *Comparison of B-mode, M-mode and echo-tracking methods for measurement of the arterial distension waveform* Ultrasound Med Biol. 1997, 23(6):879-87.
- 149) Vogel RA et al.: *A comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation using upper and lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors* Clin Cardiol. 2000 Aug, 23(8):571-5.
- 150) Uehata A et al.: *Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery* Vasc Med. 1997, 2(2):87-92.
- 151) Ducharme A et al.: *Comparison of nitroglycerin lingual spray and sublingual tablet on time of onset and duration of brachial artery vasodilation in normal subjects* Am J Cardiol. 1999 Oct, 15;84(8):952-4, A8.
- 152) Corretti MC et al.: *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force* J Am Coll Cardiol. 2002 Jan, 16;39(2):257-65.
- 153) Corretti MC et al.: *Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound* Am J Physiol. 1995 Apr, 268(4 Pt 2):H1397-404.
- 154) Joannides R et al.: *Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans* Hypertension. 1997 Dec, 30(6):1465-70.
- 155) Moncada S, Higgs A (eds): *The Vascular Endothelium*. ISBN-10 3-540-36027-1, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2006.
- 156) Rang HP, Dale MM (eds): *Rang and Dale's Pharmacology*. ISBN: 978-0-443-06911-6, Churchill Livingstone, 2007.
- 157) Bhargava A et al.: *Ocular allergic disease*. Drugs Today 1998, 34(11): 957.